

**Bruna Pereira Sorroche**

**INIBIDORES DE *CHECKPOINT* IMUNOLÓGICO: DESFECHO CLÍNICO E BIOMARCADORES PARA  
PREDIÇÃO DE RESPOSTA EM PACIENTES COM MELANOMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dra. Lidia Maria Rebolho Batista Arantes

Co-orientador: Dr. Vinicius de Lima Vazquez

Barretos, SP

2024



## FOLHA DE APROVAÇÃO



Nome: Bruna Pereira Sorroche.

Título: “Inibidores de checkpoint imunológico: desfecho clínico e biomarcadores para predição de resposta em pacientes com melanoma”.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 15/04/2024

Banca Examinadora:

Dr. Tiago da Silva Medina

Instituição: A.C.Camargo Cancer Center

Banca Examinadora:

Dr. Rodrigo Ramella Munhoz

Instituição: Hospital Sírio Libanês

Dr. Kenneth John Gollob

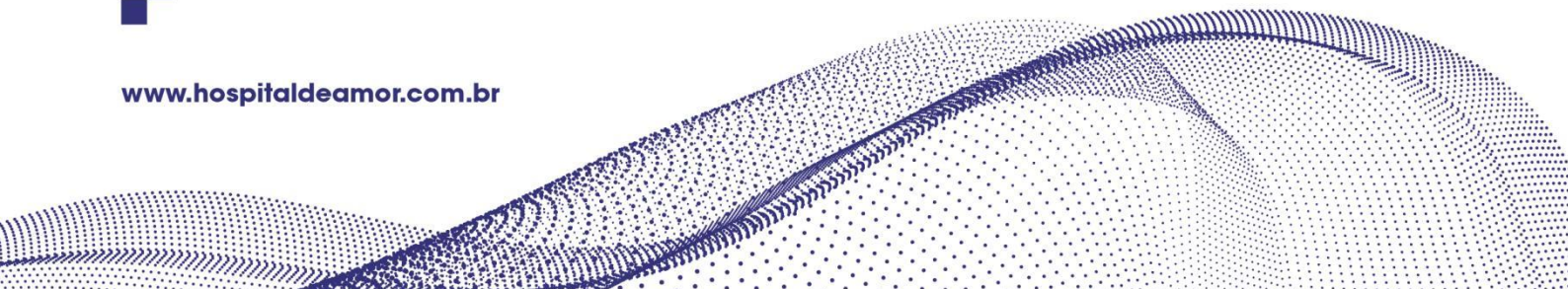
Instituição: Hospital Israelita Albert Einstein

Dra. Lidia Maria Rebolho Batista Arantes

Orientadora.

Dr. Vinicius de Lima Vazquez

Presidente da Banca.



## **SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO**

Este trabalho recebeu apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através de Bolsa de Doutorado (processo número 88887.464018/2019-00).

Este trabalho recebe apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através de Bolsa de Doutorado (processo número 2019/03570-9) e Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (processo número 2021/10922-9). As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Esta tese foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

## AGRADECIMENTOS

Deixo aqui registrados meus mais sinceros e profundos agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta tese de doutorado. Este trabalho é fruto de uma jornada coletiva, e cada um de vocês teve um papel fundamental nessa conquista.

**À minha orientadora, Dra. Lidia Arantes,** expresso minha eterna gratidão por sua orientação exemplar, por me acolher em seu grupo de pesquisa e por me guiar com sabedoria e dedicação ao longo desta trajetória. Sou profundamente grata pelas oportunidades que me proporcionou, pela confiança depositada em meu trabalho e pelos ensinamentos que transcendem a academia e me acompanharão por toda a vida.

**Ao meu co-orientador, Dr. Vinicius Vazquez,** agradeço pela valiosa contribuição ao desenvolvimento deste estudo e por seu papel essencial na minha formação científica. Sua expertise e disponibilidade foram fundamentais para o sucesso desta pesquisa.

**Aos membros da banca de acompanhamento, Dr. Ricardo Gama e Dr. Kenneth Gollob,** meu sincero agradecimento pelas críticas construtivas e sugestões que enriqueceram este trabalho. Suas contribuições foram decisivas para o aprimoramento da pesquisa e para o meu crescimento como pesquisadora.

**Aos membros da banca de defesa, Dr. Tiago Medina, Dr. Rodrigo Munhoz e Dr. Kenneth Gollob,** agradeço pela oportunidade de compartilhar meus resultados e pela rica discussão que certamente contribuirá para o avanço desta pesquisa.

**Ao meu companheiro de vida, Renan,** agradeço por ser meu porto seguro, pela cumplicidade, paciência e incentivo em todos os momentos. Seu apoio inabalável foi essencial para que eu superasse os desafios desta jornada. Você me inspira a ser melhor todos os dias, tanto pessoal quanto profissionalmente.

**À minha família,** em especial aos meus pais, dedico minha gratidão pelo amor incondicional, pela educação que me proporcionaram e pelo apoio constante em todas as etapas da minha vida. Vocês são minha base e minha inspiração.

**Aos membros dos grupos de pesquisa em Imuno-Oncologia e em Melanomas,** meu reconhecimento pela colaboração e pelo aprendizado mútuo construído ao longo dos anos. Foi um privilégio trabalhar ao lado de profissionais tão dedicados.

**Ao Dr. Massimiliano Mazzone e ao grupo de Inflamação Tumoral e Angiogênese da Catholic University of Leuven**, agradeço pela oportunidade única de aprendizado e pela colaboração que foi crucial para o meu desenvolvimento profissional.

**Aos amigos do CPOM**, meu carinho e gratidão pela companhia, pelos momentos de descontração e pelo apoio durante os anos de dedicação a esta pesquisa. Vocês tornaram essa jornada mais leve e significativa.

**Aos pacientes e seus familiares**, expressei minha profunda gratidão por sua generosidade e por permitirem que este estudo fosse realizado. Sua contribuição foi fundamental para o avanço da pesquisa em melanoma e para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Este trabalho é dedicado a vocês.

**À Dra. Iara Santana**, agradeço pela análise criteriosa das lâminas, pela sua expertise e pelo cuidado com que contribuiu para a qualidade desta pesquisa. Seu trabalho foi essencial para os resultados alcançados.

**A todos os funcionários dos departamentos do Hospital de Amor que auxiliaram nesta pesquisa**, em especial aos do Biobanco, do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM), do Departamento de Cirurgia de Melanoma, Sarcoma e Tumores Mesenquimais, do Departamento de Patologia, do Escritório de Projetos e Inovação Tecnológica (EPIT), do Instituto de Ensino e Pesquisa (IEP), do Núcleo de apoio ao pesquisador (NAP), do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME), do Registro Hospitalar de Câncer (RHC) e da Pós-Graduação, meu reconhecimento pela colaboração em diferentes etapas do estudo.

**À FAPESP e à CAPES**, agradeço pelas bolsas de estudos concedidas, que possibilitaram a realização deste trabalho.

**Ao Hospital de Amor**, expressei minha gratidão por fomentar a pesquisa científica e por proporcionar um ambiente propício para a realização deste trabalho. Este estudo é uma pequena contribuição para a missão maior de transformar vidas por meio da ciência.

“Seu trabalho vai preencher uma grande parte da sua vida, e a única maneira de ficar realmente satisfeito é fazer o que você acredita ser um ótimo trabalho. E a única maneira de fazer um ótimo trabalho é amar o que você faz.”

**Steve Jobs**

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Melanoma.....	1
1.2	Diagnóstico e tratamento.....	2
1.3	Inibidores de checkpoint imunológico .....	7
1.4	Biomarcadores de resposta à imunoterapia no melanoma .....	10
1.5	Imunoterapia no Brasil .....	11
2	JUSTIFICATIVA.....	13
3	OBJETIVOS .....	14
3.1	Objetivo Geral.....	14
3.2	Objetivos Específicos .....	14
3.3	Objetivo Exploratório .....	14
4	METODOLOGIA.....	15
4.1	Desenho do estudo.....	15
4.2	Pacientes.....	15
4.3	Coleta de amostras biológicas .....	16
4.4	Reações de PD-L1 por imuno-histoquímica .....	16
4.5	Análise dos níveis de citocinas presentes no plasma .....	17
4.6	Painel de expressão gênica – NanoString.....	18
4.7	Validação da assinatura gênica .....	22
4.8	Análise de associação com dados clínico-patológicos .....	22
4.9	Aspectos éticos .....	23
4.10	Inibição de GLUD1 em macrófagos (KU Leuven, Bélgica) .....	23
5	RESULTADOS.....	25
5.1	Dados clínico-patológicos .....	25
5.2	Avaliação de PD-L1 no tumor .....	28
5.3	Avaliação de imunomediadores no plasma .....	34
5.4	Painel de expressão gênica.....	40

5.5	Validação in silico da assinatura de expressão gênica .....	46
6	DISCUSSÃO.....	49
7	CONCLUSÃO.....	58
8	REFERÊNCIAS .....	59
	ANEXOS.....	75
	ANEXO A – Carta de aprovação do CEP .....	75
	ANEXO B – Comprovante de submissão: artigo proveniente da Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior .....	76
	ANEXO C – Artigo PD-L1 publicado.....	77
	ANEXO D – Comprovante de submissão: artigo assinatura gênica.....	89

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estadiamento clínico-patológico do melanoma, conforme descrito na 8ª edição do manual de classificação da American Joint Committee on Cancer (2017).	3
Figura 2 -	Atuação das terapias com inibidores de <i>checkpoints</i> imunológicos na atividade imune antitumoral.	5
Figura 3 -	Fluxograma de disponibilidade de amostras de tecido tumoral parafinado e sangue periférico para as análises moleculares do estudo.	16
Figura 4 -	CrITÉRIOS de seleção das amostras de tumor incluídas na análise de expressão gênica pelo painel <i>NanoString nCounter® Immunology V2</i> .	18
Figura 5 -	Distribuição da contagem bruta (em Log2) dos 579 genes avaliados no painel de expressão gênica, para cada paciente ( $n = 35$ ).	20
Figura 6 -	Mediana de variação da expressão dos 567 genes alvo para cada um dos 35 pacientes incluídos na análise de expressão gênica, antes e após a normalização por genes de referência.	21
Figura 7 -	Sobrevida pós imunoterapia de 233 pacientes com melanoma tratados com imunoterapia no Hospital de Câncer de Barretos entre 2011 e 2021.	27
Figura 8 -	Distribuição anual de 238 pacientes com melanoma avançado tratados com inibidores de <i>checkpoint</i> imunológico no Hospital de Câncer de Barretos entre 2011 e 2021.	28
Figura 9 -	Detecção de PD-L1 por imuno-histoquímica utilizando o anticorpo E1L3N.	29
Figura 10 -	Análise de correlação de Pearson entre o Tumor Proportion Score (TPS) e o Combined Positive Score (CPS) na avaliação da expressão de PD-L1 em amostras de pacientes com melanoma avançado.	30
Figura 11 -	Associação entre a sobrevida pós imunoterapia e variáveis clínicas e moleculares em 209 pacientes com melanoma tratados com inibidores de <i>checkpoint</i> imune (ICI).	33

Figura 12 -	Associação da expressão de PD-L1 com resposta ao tratamento e sobrevida em 210 pacientes com melanoma tratados com inibidores de <i>checkpoint</i> imunológico (ICI), estratificada por tipo de amostra analisada (tumor primário [ $n = 113$ ] e metástases [ $n = 97$ ]).	34
Figura 13 -	Concentração (pg/mL) das sete citocinas analisadas no plasma de 84 pacientes com melanoma avançado submetidos à imunoterapia no Hospital de Câncer de Barretos.	37
Figura 14 -	Sobrevida global após imunoterapia em pacientes com melanoma avançado ( $n = 84$ ), estratificada pela concentração plasmática das citocinas.	39
Figura 15 -	Genes diferencialmente expressos nos pacientes respondedores ( $n = 18$ ) e não respondedores ( $n = 17$ ) às terapias anti-PD-1.	42
Figura 16 -	<i>Heatmap</i> dos valores normalizados de expressão dos 21 genes diferencialmente expressos entre respondedores ( $n = 18$ ) e não respondedores ( $n = 17$ ) à terapia com inibidores de PD-1.	43
Figura 17 -	Análise de enriquecimento de Processos Biológicos dos 18 genes superexpressos em pacientes não respondedores ao tratamento com anti-PD-1.	44
Figura 18 -	Valor prognóstico da assinatura preditiva baseada em 4 genes (CD24, NFIL3, FN1 e KLRK1) em pacientes com melanoma tratados com imunoterapia ( $n = 35$ ).	45
Figura 19 -	Poder preditivo da assinatura de 4 genes para resposta à imunoterapia, estratificado por estadiamento ao diagnóstico dos pacientes.	46
Figuras 20 -	Validação do escore preditivo de 4 genes para resposta às terapias anti-PD-1 em duas coortes independentes.	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características clínico-patológicas e de tratamento dos 238 pacientes com melanoma avançado tratados com imunoterapia no Hospital de Câncer de Barretos no período de 2011 a 2021.	25
Tabela 2 -	Disponibilidade e origem das amostras de tecido tumoral incluídas em parafina de 210 pacientes com melanoma do Hospital de Câncer de Barretos para análise de expressão de PD-L1 por imunohistoquímica.	29
Tabela 3 -	Características clínico-patológicas e de tratamento dos 210 pacientes com melanoma avançado tratados com inibidores de <i>checkpoint</i> imunológico, estratificados por grupos de resposta à terapia.	30
Tabela 4 -	Análises univariada e multivariada para avaliação do impacto das características clínicas e moleculares na falha de resposta terapêutica em pacientes com melanoma avançado tratados com inibidores de <i>checkpoint</i> imune.	32
Tabela 5 -	Características clínico-patológicas e de tratamento dos 84 pacientes com melanoma avançado tratados com imunoterapia baseada em inibidores de <i>checkpoint</i> imune, cujas amostras de plasma estavam disponíveis no Biobanco.	35
Tabela 6 -	Associação entre os níveis de citocinas e razões imunes, quantificados por Cytometric Bead Array (CBA), e a resposta terapêutica e sobrevida em 84 pacientes com melanoma tratados com inibidores de <i>checkpoint</i> imune.	38
Tabela 7 -	Análise de regressão logística binária uni- e multivariada para predição de falha de resposta à imunoterapia em pacientes com melanoma avançado tratados com inibidores de <i>checkpoint</i> imune no Hospital de Câncer de Barretos entre 2011 e 2021.	39
Tabela 8 -	Características clínico-patológicas e de tratamento dos 35 pacientes com melanoma avançado tratados com anti-PD-1 submetidos à	40

análise de expressão gênica utilizando o painel NanoString nCounter Immunology V2, estratificados por resposta à terapia.

- Tabela 9 - Análise de regressão logística binária uni- e multivariada para predição de falha de resposta à imunoterapia em pacientes com melanoma avançado. 46
- Tabela 10 - Caracterização dos pacientes das coortes independentes de validação, derivadas de estudos previamente publicados. A coorte 1 é composta por 23 pacientes selecionados, enquanto a coorte 2 inclui 26 pacientes. 47
- Tabela 11 - Comparação da positividade de PD-L1 e taxas de resposta em casos com expressão negativa de PD-L1 em pacientes com melanoma tratados com imunoterapia em diferentes populações. 50

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC	Área sob a curva
BEPE	Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior
CBA	Cytometric Bead Array
CPOM	Centro Pesquisa em Oncologia Molecular
CPS	<i>Combined Positive Score</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
DE	Doença estável
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Estadio clínico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FFPE	Fixado em formalina e embebido em parafina, do inglês <i>formalin-fixed paraffin-embedded</i>
FKPM	Fragmentos por quilobase de transcrição por milhão de leituras mapeadas
FOVs	Focos de visão
GEO	Gene Expression Omnibus
GLUD1	Glutamato desidrogenase-1
H&E	Hematoxilina e eosina
HCB	Hospital de Câncer de Barretos
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICI	Inibidores de <i>checkpoint</i> imunológicos
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IHC	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
iRECIST	Critérios de resposta para uso em ensaios testando imunoterapêutica
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LAG-3	<i>Lymphocyte-activation gene 3</i>
mAbs	Anticorpos monoclonais

MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
μL	Microlitros
mL	Mililitros
ng	Nanogramas
NK	<i>Natural killer</i>
PD	Progressão de doença
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
pg	Picogramas
RC	Resposta completa
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
ROC	Característica operacional do receptor
RP	Resposta parcial
RR	Riscos relativos
scRNA-seq	Sequenciamento de RNA de células únicas
SEDO	Sem evidência de doença
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TILs	Linfócitos infiltrantes de tumor, do inglês <i>tumor infiltrating lymphocytes</i>
TIM-3	<i>T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
TNM	Tumor, Linfonodo, Metástase
TPS	<i>Tumor Proportion Score</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\beta$	Coeficiente de regressão
X	Expressão absoluta do gene
°C	Grau Celsius
=	Igual
>	Maior
$\geq$	Maior ou igual
<	Menor
$\leq$	Menor ou igual
%	Por cento

## RESUMO

Sorroche BP. Inibidores de *checkpoint* imunológico: desfecho clínico e biomarcadores para predição de resposta em pacientes com melanoma. **Tese (Doutorado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2024.

**Introdução:** O melanoma representa cerca de 6% dos tumores de pele e, apesar da baixa incidência relativa, apresenta substancial risco de metastatização e óbito. Tumores iniciais são de bom prognóstico e tratados de forma simples, em geral com cirurgias de pequeno porte. Já o tratamento da doença avançada requer cirurgias complexas, radioterapia, e diversas abordagens terapêuticas sistêmicas. Crescentes avanços no tratamento de melanomas irresssecáveis e/ou metastáticos foram alcançados com a aprovação de anticorpos monoclonais inibidores de *checkpoints* imunológicos (ICI), que estimulam a atividade imunológica celular antitumoral adquirida. Entretanto, esta terapia é de alto custo, não é isenta de efeitos adversos e é pouco efetiva em uma grande parcela dos pacientes. **Objetivo:** O objetivo deste estudo é investigar marcadores moleculares capazes de prever a resposta terapêutica, ou sua falha, no uso de ICI em portadores de melanoma avançado. **Materiais e Métodos:** Foram selecionados todos os pacientes com melanoma avançado que realizaram tratamento imunoterápico com anti-PD-1 ou anti-CTLA-4 no Hospital de Câncer de Barretos (HCB) entre 2011 e 2021, com amostras biológicas disponíveis. Foi avaliado o perfil de expressão de 579 genes relacionados a imunologia em amostras tumorais incluídas em parafina, utilizando-se a plataforma NanoString e o painel Immunology V2. Além disso, a expressão de PD-L1 tumoral por imunohistoquímica e a liberação de imunomediadores no plasma por Cytometric Bead Array foram analisados. Os resultados moleculares foram associados a dados demográficos, clínicos, histopatológicos e relacionados a resposta terapêutica e sobrevida dos pacientes, utilizando-se os softwares IBM SPSS e o ambiente R. **Resultados:** Este estudo identificou biomarcadores preditivos de resistência primária ao tratamento com ICI em pacientes com melanoma avançado. A ausência de expressão de PD-L1 no tumor foi associada a uma menor taxa de resposta objetiva ( $p = 0,010$ ) e pior sobrevida global ( $p = 0,048$ ), especialmente na análise com amostras provenientes de tecido tumoral metastático. Níveis elevados de IL-6 no plasma ( $p = 0,019$ ) foram associados a uma menor taxa de resposta, enquanto IL-4 e IL-10 foram correlacionados com pior sobrevida global ( $p = 0,001$

e  $p = 0,010$ , respectivamente). Ademais, o aumento no escore baseado em uma assinatura de expressão de 4 genes (*CD24*, *NFIL3*, *FN1* e *KLRK1*) demonstrou alta acurácia preditiva (AUC = 0,935;  $p < 0,001$ ), com pacientes no grupo de alto escore apresentando menor probabilidade de resposta ao tratamento ( $p < 0,001$ ) e sobrevida reduzida ( $p < 0,001$ ). A assinatura gênica foi validada em duas coortes independentes. Esses achados destacam a importância de biomarcadores moleculares e imunológicos, como a expressão de PD-L1, a assinatura de 4 genes e o perfil de citocinas, na predição de resistência primária e desfechos clínicos. **Conclusão:** Evidenciamos o uso de PD-L1, uma assinatura de 4 genes e a concentração de IL-6 no plasma como potenciais biomarcadores preditivos de resposta à imunoterapia, que poderiam ser utilizados em conjunto com dados clínicos dos pacientes para identificar de forma precisa os pacientes que não se beneficiariam destas terapias, além de se apresentarem como novos potenciais alvos terapêuticos.

**Palavras-chave:** Melanoma; Imunoterapia; Inibidores de *checkpoint* imunológico; Biomarcadores.

## ABSTRACT

Sorroche BP. Immune-*checkpoint* inhibitors: clinical outcome and biomarkers to predict response in melanoma patients. **Thesis (Ph.D. degree)**. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2024.

**Background:** Melanoma accounts for approximately 6% of skin tumors and, despite its relatively low incidence, carries a substantial risk of metastasis and death. Early-stage tumors have a good prognosis and are typically treated with simple surgeries. However, advanced disease requires complex surgeries, radiotherapy, and various systemic therapeutic approaches. Significant advances in the treatment of unresectable and/or metastatic melanoma have been achieved with the approval of monoclonal antibodies targeting immune *checkpoints* (ICI), which stimulate acquired antitumor cellular immune activity. However, this therapy is costly, not free from adverse effects, and ineffective in a significant proportion of patients. **Aim:** This study aimed to investigate molecular markers capable of predicting therapeutic response, or its failure, to ICI in patients with advanced melanoma. **Material and Methods:** All patients with advanced melanoma who underwent immunotherapy with anti-PD-1 and/or anti-CTLA-4 at the Barretos Cancer Hospital (BCH) between 2011 and 2021 with available biological samples were selected. The expression profile of 579 immune-related genes in paraffin-embedded tumor samples was evaluated using the NanoString platform and the Immunology V2 panel. Additionally, tumor PD-L1 expression by immunohistochemistry and plasma immunomediators by Cytometric Bead Array were analyzed. Molecular results were associated with demographic, clinical, histopathological, and treatment response and survival data using IBM SPSS software and the R environment. **Results:** This study identified predictive biomarkers of primary resistance to ICI treatment in patients with advanced melanoma. The absence of PD-L1 expression in the tumor was associated with a lower objective response rate ( $p = 0.010$ ) and worse overall survival ( $p = 0.048$ ), particularly in the analysis of metastatic tumor tissue samples. Elevated plasma levels of IL-6 ( $p = 0.019$ ) were associated with a lower response rate, while IL-4 and IL-10 were correlated with worse overall survival ( $p = 0.001$  and  $p = 0.010$ , respectively). Furthermore, an increased score based on a 4-gene expression signature (*CD24*, *NFIL3*, *FN1*, and *KLRK1*) demonstrated high predictive accuracy (AUC = 0.935;  $p < 0.001$ ), with patients in the high-score group showing a lower

likelihood of treatment response ( $p < 0.001$ ) and reduced survival ( $p < 0.001$ ). The gene signature was validated in two independent cohorts. These findings highlight the importance of molecular and immunological biomarkers, such as PD-L1 expression, the 4-gene signature, and cytokine profiles, in predicting primary resistance and clinical outcomes. **Conclusion:** We demonstrated the potential use of PD-L1, a 4-gene signature, and plasma IL-6 levels as predictive biomarkers of immunotherapy response. These biomarkers could be used in conjunction with clinical data to accurately identify patients unlikely to benefit from these therapies and may also represent new potential therapeutic targets.

**Keywords:** Melanoma; Immunotherapy; Immune *checkpoint* inhibitors; Biomarkers.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Melanoma

Atualmente, o câncer é considerado a principal causa de mortes no mundo<sup>1</sup>. A *Internacional Agency for Research on Cancer (IARC)* estimou para 2022 cerca de 20 milhões de novos casos e 9,7 milhões de mortes<sup>2</sup>.

O câncer de pele é o tipo de câncer mais frequente no mundo, representando um em cada três casos de câncer diagnosticados<sup>3</sup>. Os subtipos mais comuns são o carcinoma basocelular, o carcinoma de células escamosas e o melanoma, que detém a maior letalidade<sup>4, 5</sup>.

Para o melanoma, a taxa de incidência mundial para 2022 foi de 331.649 novos casos<sup>6</sup>, enquanto a taxa de incidência brasileira anual prevista para o triênio 2023-2025<sup>7</sup> é de 8.980 novos casos. Uma revisão sistemática e meta-análise publicada em 2005 evidenciou que características fenotípicas e a exposição solar cumulativa são fatores preditivos significativos para o desenvolvimento do melanoma<sup>8</sup>. O estudo, que analisou 60 artigos, utilizou modelos de efeitos fixos e aleatórios para calcular riscos relativos (RR) associados a cada fator, destacando a importância de aspectos como histórico familiar de melanoma (RR = 1,74), tipo de pele (fototipo I vs. IV: RR = 2,09), alta densidade de sardas (RR = 2,10), cor da pele clara (RR = 2,06), olhos azuis (RR = 1,47), cabelos ruivos (RR = 3,64), lesões pré-malignas e câncer de pele (RR = 4,28) e indicadores de dano actínico (RR = 2,02) como determinantes relevantes para aumento do risco de melanoma<sup>8</sup>.

Os melanomas se originam dos melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina que colonizam a pele, olhos, mucosas e outros tecidos do corpo durante o desenvolvimento<sup>9</sup>. Devido aos diferentes locais nos quais estas células se encontram, elas podem dar origem a diferentes tipos de melanoma<sup>10</sup>. Existem quatro tipos principais de melanomas cutâneos, classificados com base em características clínicas, histopatológicas e moleculares: melanoma extensivo superficial, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno e melanoma lentiginoso acral<sup>11</sup>. O melanoma extensivo superficial é o subtipo mais comum, representando cerca de 70% dos casos. Ele se caracteriza por lesões assimétricas, com bordas irregulares e variação de cores, e está frequentemente associado a mutações no gene *BRAF*. O melanoma nodular, que corresponde a 15-30% dos casos, é conhecido por seu comportamento mais agressivo, com crescimento rápido e invasão precoce das camadas mais

profundas da pele, podendo estar relacionado a mutações em *BRAF* ou *NRAS*. O melanoma lentigo maligno, comum em idosos e associado à exposição solar crônica, surge a partir de lesões pré-existentes e pode apresentar mutações em *BRAF* ou *NRAS*. Por fim, o melanoma lentiginoso acral, mais prevalente em indivíduos com pele mais escura, ocorre em áreas não expostas ao sol, como palmas das mãos, solas dos pés e sob as unhas, e está frequentemente associado a ampliações no gene *KIT*<sup>11-13</sup>.

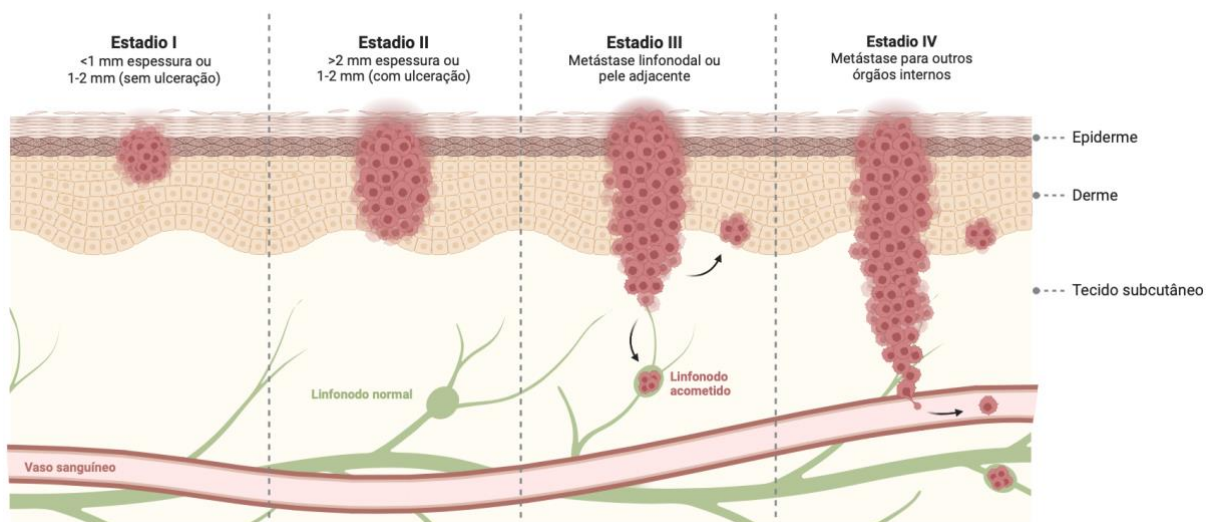
Existem também subtipos mais raros e distintos, como os melanomas de mucosa e oculares<sup>11</sup>. O melanoma de mucosa ocorre em superfícies mucosas, como cavidade oral, trato gastrointestinal, nasal, sinusal e geniturinário, representando cerca de 1% de todos os melanomas. Esses tumores são frequentemente diagnosticados em estágios avançados devido à sua localização de difícil acesso e à falta de sintomas precoces. Molecularmente, os melanomas de mucosa apresentam baixa frequência de mutações em *BRAF* e *NRAS*, mas podem exibir alterações em *KIT*, *SF3B1* e ampliações em *CCND1*. Já o melanoma ocular, que inclui o melanoma uveal (o mais comum, afetando a íris, corpo ciliar e coróide) e o melanoma conjuntival, é responsável por aproximadamente 5% de todos os melanomas. O melanoma uveal está frequentemente associado a mutações em *GNAQ* e *GNA11*, além de alterações em *BAP1*, que estão ligadas a um pior prognóstico. O melanoma conjuntival, por sua vez, compartilha algumas características moleculares com o melanoma cutâneo, como mutações em *BRAF*. Ambos os subtipos (mucosa e ocular) têm um comportamento biológico agressivo e são desafiadores no tratamento, exigindo abordagens multidisciplinares e personalizadas com base em suas alterações moleculares específicas<sup>11-13</sup>.

## 1.2 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico de presunção do melanoma se dá pelo exame clínico de lesões pigmentadas suspeitas da pele, onde são observados assimetria, irregularidade nas bordas, heterogeneidade de cores, tamanho da lesão e evolução (alteração) no decorrer do tempo (regra do ABCDE)<sup>14</sup>. Para auxiliar no diagnóstico, é feito uso da dermatoscopia, uma técnica não invasiva com o uso de lentes de aumento, capaz de aumentar significativamente a acurácia da detecção<sup>15</sup>.

Para estadiamento do tumor é utilizado o sistema tumor, linfonodo, metástase (TNM), que está em sua oitava edição<sup>16</sup>, e leva em consideração a espessura máxima da lesão (medida pelo índice de Breslow), a taxa mitótica, a presença de ulceração, o comprometimento de

linfonodos e a presença de metástases a distância. Essa classificação é essencial para orientar o tratamento e o prognóstico dos pacientes<sup>17</sup>. A classificação TNM divide o melanoma em cinco estágios principais (0 a IV), que refletem a progressão da doença (**Figura 1**). O estágio 0 representa o melanoma *in situ*, confinado à epiderme, sem invasão ou risco de disseminação. Nos estágios I e II, o tumor é localizado, com espessura variável e possível ulceração, mas sem envolvimento de linfonodos ou metástases à distância. O estágio III indica disseminação para linfonodos regionais ou metástases em trânsito (lesões cutâneas ou subcutâneas entre o tumor primário e os linfonodos regionais), com subdivisões que consideram o número de linfonodos afetados e a carga tumoral (micro ou macrometástases). Já o estágio IV corresponde à doença metastática, com disseminação para órgãos distantes, como pulmões, fígado ou cérebro, associado a um prognóstico mais reservado<sup>16, 17</sup>.



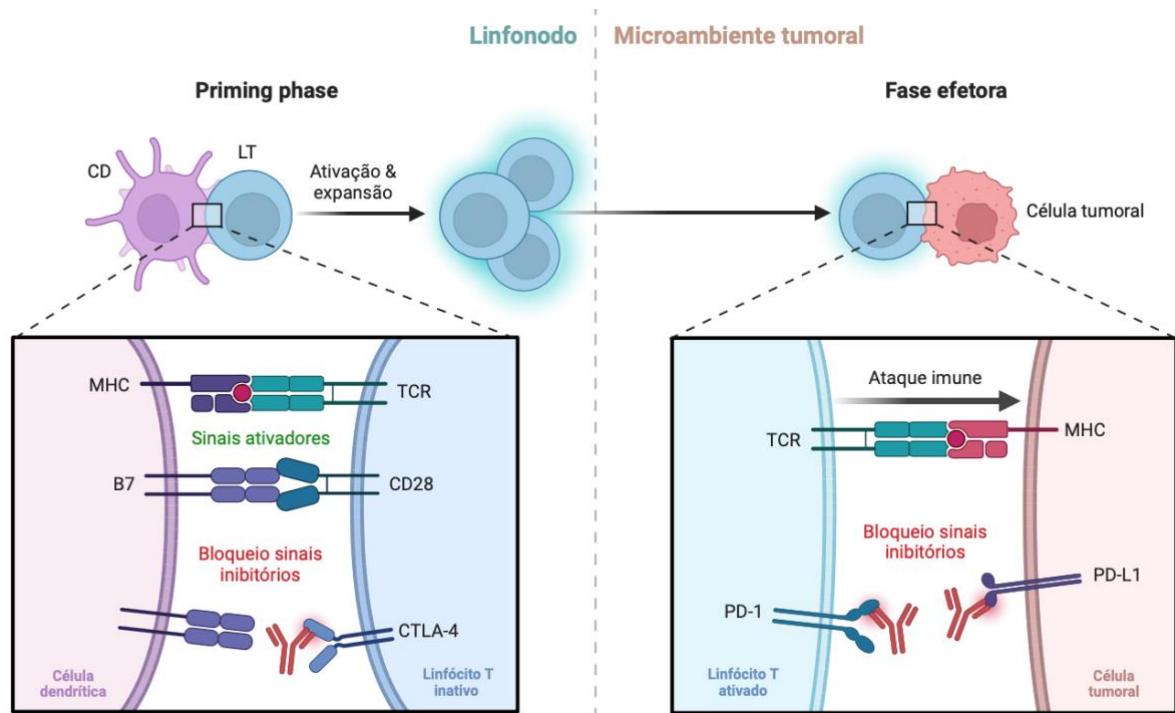
**Fonte:** Adaptado do Biorender.

**Figura 1** - Estadiamento clínico-patológico do melanoma, conforme descrito na 8ª edição do manual de classificação da American Joint Committee on Cancer (2017). O melanoma tem início com um crescimento anormal localizado na epiderme (fase *in situ*), avançando gradualmente em tamanho e profundidade até atingir as camadas mais profundas da pele. À medida que progride, pode invadir a corrente sanguínea, o sistema linfático e os tecidos adjacentes, com potencial para se disseminar para outras regiões do corpo.

Considera-se bom prognóstico quando o tumor é diagnosticado e tratado em seu estágio inicial (tumores finos sem metástases linfonodais ou distantes)<sup>4</sup>, sendo possível alcançar uma sobrevida em 5 anos em torno de 98% dos casos<sup>18</sup>. Para tal, o tratamento é feito

através da excisão do tumor com adequadas margens de segurança<sup>19, 20</sup>. Pode-se realizar a biópsia do(s) linfonodo(s) sentinela para o microestadiamento linfonodal e, se este linfonodo for positivo para células tumorais, uma cirurgia linfonodal mais extensa ou tratamento sistêmico adjuvante podem ser empregados<sup>21, 22</sup>. Já o tratamento para melanomas avançados pode envolver cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia alvo ou imunoterapia<sup>20</sup>. Nestes casos, quando o melanoma é diagnosticado em estadio III (envolvimento linfonodal), a taxa de sobrevivência em 5 anos é de 62,4%, enquanto para casos com estadio IV (doença metastática à distância) é em torno de 18%<sup>18</sup>.

Até cerca de uma década atrás, o tratamento de pacientes com melanoma avançado era bastante limitado, com opções de terapia sistêmica pouco eficazes e frequentemente mal toleradas<sup>23, 24</sup>. No entanto, a partir de 2011, houve avanços significativos no manejo de melanomas irresssecáveis e/ou metastáticos, transformando o panorama terapêutico e oferecendo novas esperanças para os pacientes. Neste período, o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou novos agentes para tratamento destes tumores, incluindo 5 anticorpos monoclonais inibidores de *checkpoints* imunológicos (ICI): ipilimumabe<sup>25</sup>, que bloqueia a interação entre *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA-4) e B7, nivolumabe<sup>26</sup>, pembrolizumabe<sup>26</sup> e atezolizumabe<sup>27</sup>, que inibem as interações entre os receptores *programmed cell death protein 1* (PD-1) dos linfócitos T e os ligantes *programmed death-ligand* (PD-L)1 e PD-L2 das células tumorais (**Figura 2**) e, mais recentemente, relatlimabe<sup>28</sup>, que inibe a proteína *lymphocyte activation gene-3* (LAG-3) expressa por linfócitos citotóxicos exaustos.



Fonte: Adaptado de Ribas et al.<sup>29</sup>.

**Figura 2** - Atuação das terapias com inibidores de *checkpoints* imunológicos na atividade imune antitumoral. A ativação dos linfócitos T (LT) ocorre com a interação entre o receptor de linfócitos T e o antígeno no linfonodo, em conjunto com o complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Além disso, é necessária a ligação de B7, presente nas células apresentadoras de antígeno, como as células dendríticas (CD), ao receptor coestimulatório CD28 nos linfócitos T. CTLA-4, um homólogo estrutural de CD28, liga-se ao B7 com maior afinidade, exercendo, assim, uma função reguladora negativa sobre a ativação das células T. Os inibidores de CTLA-4, como o ipilimumabe, bloqueiam a ligação do CTLA-4 ao B7, favorecendo a ativação e proliferação de células efetoras. Por outro lado, PD-1 regula a ativação dos linfócitos T no microambiente tumoral. O receptor PD-1 é encontrado em linfócitos T exaustos, enquanto o PD-L1 é predominantemente expresso por células tumorais e macrófagos infiltrantes. No microambiente tumoral, a interação entre PD-1 e PD-L1 reduz a produção de citocinas e a expressão de fatores de transcrição, elementos essenciais para a função efetora destes linfócitos. Os inibidores de PD-1/PD-L1, como nivolumabe e atezolizumabe, bloqueiam essa interação, restaurando a capacidade dos linfócitos T de combater o tumor.

Os ensaios clínicos com ICI demonstraram resultados promissores no tratamento do melanoma, com melhoras significativas na resposta e na sobrevida destes pacientes. O estudo CA184-002<sup>30</sup>, um dos primeiros ensaios clínicos a avaliar o ipilimumabe (anti-CTLA-4) no tratamento do melanoma avançado, demonstrou benefícios significativos em termos de sobrevida e controle da doença. Os resultados mostraram que o ipilimumabe proporcionou

uma taxa de sobrevida global em 1 ano de 45,6%, em comparação com 25,3% no grupo controle que recebeu gp100 (um peptídeo vacinal). Além disso, a mediana de sobrevida global foi de 10,1 meses no grupo tratado com ipilimumabe, contra 6,4 meses no grupo controle. No estudo CA184-024<sup>31</sup>, que comparou a combinação de ipilimumabe + dacarbazina (quimioterápico) com dacarbazina em monoterapia, a taxa de resposta objetiva foi de 15,2% no grupo que recebeu ipilimumab, em comparação com 10,3% no grupo tratado apenas com dacarbazina. Além disso, a combinação demonstrou uma melhora significativa na sobrevida global, com taxas de 47,3% no primeiro ano, 28,5% aos 2 anos e 20,8% aos 3 anos, em comparação com 36,3%, 17,9% e 12,2%, respectivamente, no grupo que recebeu apenas dacarbazina.

Relacionado às terapias anti-PD-1, o estudo CheckMate 066<sup>26</sup>, que comparou o nivolumabe com a dacarbazina em pacientes com melanoma metastático sem mutação em *BRAF*, o nivolumab demonstrou uma taxa de resposta objetiva de 40,0%, em contraste com 13,9% para dacarbazina. Além disso, a sobrevida global foi significativamente maior no grupo tratado com nivolumabe, com uma taxa em 1 ano de 72,9%, comparada a 42,1% no grupo que recebeu apenas quimioterapia. No CheckMate 037<sup>32</sup>, que avaliou nivolumabe em pacientes que previamente progrediram ao tratamento com ipilimumabe, mostrou uma taxa de resposta objetiva de 31,7%. Já no KEYNOTE-006<sup>33</sup>, que comparou pembrolizumabe com ipilimumabe, a taxa de resposta objetiva foi de 33,7% para pembrolizumab administrado a cada 2 semanas e 32,9% para a administração a cada 3 semanas, em contraste com 11,9% para ipilimumabe. A sobrevida global também foi superior no grupo pembrolizumabe, com taxas em 1 ano de 74,1% (a cada 2 semanas) e 68,4% (a cada 3 semanas), comparadas a 58,2% para ipilimumabe. Por fim, no estudo KEYNOTE-002<sup>34</sup>, que avaliou o pembrolizumabe em pacientes refratários ao tratamento com ipilimumabe, observou-se uma melhora significativa nas taxas de sobrevida livre de progressão aos 6 meses: 34,0%-38,0% no grupo que recebeu pembrolizumabe versus 16,0% no grupo que recebeu quimioterapia, demonstrando atividade antitumoral mesmo em pacientes refratários.

A combinação de nivolumabe e ipilimumabe foi avaliada no CheckMate 067<sup>35</sup>, que comparou a terapia combinada com a monoterapia de cada agente. A taxa de resposta objetiva foi de 58,0% para a combinação, 44,0% para nivolumabe sozinho e 19,0% para ipilimumabe sozinho. A taxa de sobrevida global em 3 anos foi de 58,0% para a combinação, 52% para nivolumabe sozinho e 34% para ipilimumabe sozinho. Além disso, a

combinação mostrou uma melhora significativa na sobrevida livre de progressão, com uma mediana de 11,5 meses, comparada a 6,9 meses para nivolumabe e 2,9 meses para ipilimumabe. No entanto, a combinação foi associada a uma maior incidência de efeitos adversos graves.

O atezolizumabe (anti-PD-L1) foi estudado no IMspire150<sup>27</sup>, que avaliou sua combinação com cobimetinibe (inibidor de MEK) e vemurafenibe (inibidor de BRAF) em pacientes com melanoma com mutação em *BRAF*. A taxa de resposta objetiva foi semelhante entre os grupos; no entanto, observou-se uma melhora significativa na sobrevida livre de progressão, com uma mediana de 15,1 meses no grupo que recebeu a combinação de terapia alvo e imunoterapia, em comparação com 10,6 meses no grupo tratado apenas com vemurafenibe e cobimetinibe.

Por fim, o relatlimabe (anti-LAG-3) foi avaliado no estudo RELATIVITY-047<sup>28</sup>, que comparou a combinação de relatlimabe e nivolumabe com nivolumabe em monoterapia em pacientes com melanoma avançado previamente não tratado. A combinação relatlimabe-nivolumabe demonstrou uma melhora significativa na sobrevida livre de progressão, com uma mediana de 10,1 meses, em comparação com 4,6 meses para nivolumab em monoterapia, sugerindo que a inibição dual de LAG-3 e PD-1 pode ser mais eficaz no controle da progressão da doença.

Esses resultados destacam o impacto transformador dos ICIs, tanto em monoterapia quanto em combinação, no aumento das taxas de resposta objetiva, sobrevida livre de progressão e sobrevida global para pacientes com melanoma avançado. Tais achados consolidam o papel central dessas terapias no manejo da doença, estabelecendo a imunoterapia como o padrão-ouro no tratamento de primeira linha para o melanoma avançado.

### **1.3 Inibidores de *checkpoint* imunológico**

O sistema imunológico monitora as células normalmente encontradas no organismo, sendo capaz de distingui-las de células anormais e fazer com que o próprio organismo ataque essas células estranhas. Para isso, ele utiliza *checkpoints* (pontos de verificação), que são moléculas presentes em certas células imunes e servem para modular as respostas imunes fisiológicas, a fim de evitar respostas inflamatórias excessivas ou o desenvolvimento de autoimunidade<sup>36</sup>. No entanto, as células tumorais são capazes de explorar esses *checkpoints*

para evitar serem atacadas pelo sistema imune, criando um mecanismo de evasão imunológica<sup>37</sup>.

Células imunológicas podem ser encontradas dentro e ao redor de tumores. Essas células são chamadas de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) e são uma indicação de que o sistema imunológico está ativo com resposta inflamatória ao tumor. Células imunológicas podem ser encontradas dentro e ao redor de tumores. Essas células são chamadas de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) e são uma indicação de que o sistema imunológico está ativo, gerando uma resposta inflamatória ao tumor. A presença de TILs no tumor de um paciente é frequentemente associada a um melhor prognóstico, pois esses linfócitos têm a capacidade de reconhecer e eliminar as células tumorais no microambiente tumoral<sup>38-40</sup>. No entanto, após a ativação, os linfócitos T expressam receptores de *checkpoint* imunológico, como PD-1 e CTLA-4, para manter a tolerância aos autoantígenos e evitar danos ao tecido saudável<sup>41</sup>. Esse mecanismo, que é essencial para a homeostase imunológica, pode ser cooptado pelas células tumorais para suprimir a resposta imune.

Durante a ativação crônica no microambiente tumoral, os linfócitos T adquirem um estado disfuncional, que pode se manifestar como anergia ou exaustão<sup>41-43</sup>. A anergia é um estado de inativação funcional dos linfócitos T, no qual eles se tornam incapazes de responder a antígenos específicos, mesmo na presença de estímulos adequados. Esse fenômeno é frequentemente induzido pela falta de sinalização coestimulatória ou pela presença de moléculas coinibitórias, como CTLA-4 e PD-1, que impedem a ativação completa destes linfócitos. Além disso, a ação supressora dos linfócitos T reguladores no microambiente tumoral também contribui para a indução de anergia, limitando a capacidade do sistema imunológico de combater o tumor<sup>42, 43</sup>. Por outro lado, a exaustão de linfócitos T é um estado de disfunção progressiva que ocorre em resposta à estimulação antigênica crônica<sup>41</sup>. Linfócitos T exauridos perdem sua capacidade de proliferar, secretar citocinas (como IFN- $\gamma$  e IL-2) e mediar a citotoxicidade, tornando-se ineficazes na eliminação das células tumorais<sup>41</sup>. Essas células também expressam altos níveis de receptores inibitórios, como PD-1, CTLA-4, TIM-3 e LAG-3<sup>44</sup>, que interagem com seus ligantes no microambiente tumoral, suprimindo ainda mais sua função. Quanto maior o número de receptores inibitórios coexpressos por linfócitos T exaustos, mais severa é a exaustão<sup>45</sup>. Além disso, a exaustão está associada a alterações epigenéticas e transcricionais que modificam permanentemente o perfil funcional dessas células<sup>46</sup>, bem como a disfunções metabólicas, como a redução na glicólise e na

fosforilação oxidativa, que limitam sua capacidade de gerar energia e realizar funções efetoras<sup>47, 48</sup>.

A exaustão, portanto, representa um obstáculo significativo para a resposta imune antitumoral, onde a regulação de receptores inibitórios pelos linfócitos T pode levar a uma perda do potencial proliferativo e da função efetora dessas células<sup>41</sup>. No entanto, ao contrário da anergia, que é mais difícil de reverter, a exaustão pode ser parcialmente revertida por meio de terapias como o bloqueio de vias inibitórias (por exemplo, com anti-PD-1/PD-L1)<sup>42</sup>. O bloqueio simultâneo de múltiplos receptores inibitórios tem mostrado resultados sinérgicos na reversão da exaustão, restaurando parcialmente a função dos linfócitos T e melhorando a resposta antitumoral<sup>45</sup>.

Fourcade e colaboradores<sup>49</sup> demonstraram que linfócitos que exibem co-expressão de PD-1 e TIM-3 apresentam produção de citocinas inflamatórias e capacidade de proliferação reduzida em pacientes com melanoma. Outros estudos demonstraram que a co-expressão destes *checkpoints* imunológicos levou à resistência ao tratamento imunoterápico<sup>50, 51</sup> e que o uso de combinações de tratamentos, como inibidores de LAG-3 e PD-1<sup>52</sup> ou TIM-3 e PD-1<sup>53</sup> demonstraram melhores respostas em modelos pré-clínicos. Por estas razões, anticorpos monoclonais (mAbs) bloqueadores de *checkpoints* imunológicos tem se mostrado eficazes no tratamento de múltiplos tipos de câncer, incluindo o melanoma. O bloqueio destes *checkpoints*, que regulam a duração e extensão das respostas imunes, é uma abordagem pela qual a imunidade antitumoral de células T pode ser reativada. Assim, mAbs que visam estes marcadores podem bloquear sua ligação e aumentar a resposta imune contra células tumorais<sup>37, 45</sup>.

Outra estratégia sob recente investigação é a modulação destes *checkpoints* utilizando anticorpos que fornecem um sinal agonístico via ativação de receptores nos linfócitos T. Um dos alvos é OX40 (CD134), um membro da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR). Esta molécula coestimuladora é regulada positivamente nos linfócitos T efetores após a ativação e suporta diferenciação, proliferação e sobrevivência a longo prazo. Além disso, media a inibição da atividade supressora dos linfócitos T reguladores, que contribuem para a evasão de células tumorais da imunidade de linfócitos T<sup>54</sup>. A aplicação de agonistas do OX40, isoladamente ou em combinação com outros moduladores de *checkpoint*, estimulou a atividade citotóxica dos linfócitos T e causou a regressão do tumor em modelos pré-clínicos<sup>55-57</sup>. Assim como os resultados apresentados com o OX40, outro membro da

família TNFR também apresentou bons resultados: 4-1BB (CD137), que está envolvido na ativação e função dos linfócitos, incluindo expansão, sobrevivência e produção de citocinas por linfócitos T efetores<sup>58</sup>.

#### 1.4 Biomarcadores de resposta à imunoterapia no melanoma

As células tumorais possuem mecanismos específicos que permitem que elas escapem do reconhecimento e ação do sistema imunológico<sup>59</sup>. Para isso, estas células são capazes de regular negativamente algumas características próprias que as tornam reconhecíveis pelas células do sistema imune, como antígenos tumorais<sup>60</sup>, ou podem se aproveitar de mecanismos de *feedback* negativo que o próprio organismo possui como forma de evitar uma doença autoimune<sup>61, 62</sup>, incluindo os receptores inibitórios como PD-1 e CTLA-4.

Considerando então que a ativação de muitos dos *checkpoints* imunes está associada a uma interação entre ligante e receptor, moléculas capazes de bloquear essa ligação, seja através de anticorpos ou de formas recombinantes dos próprios ligantes/receptores, poderiam ser utilizadas<sup>63</sup>. A função dos mAbs ICI é induzir a resposta imune antitumoral ao reativar os linfócitos T exaustos no microambiente tumoral do indivíduo<sup>64</sup>. Esses agentes foram responsáveis por induzir respostas objetivas duradouras em cerca de 40% e aumentar a sobrevida global dos pacientes com melanoma<sup>26</sup>, além de outros subtipos tumorais, como câncer de pulmão de não pequenas células<sup>65</sup>, câncer renal<sup>66</sup> e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço<sup>67</sup>.

Entretanto, apenas uma parcela dos pacientes se beneficia com o tratamento, e as características celulares e moleculares associadas a essa resposta precisam ser melhor elucidadas<sup>68</sup>. Estudos envolvendo a busca de marcadores biológicos capazes de identificar respondedores e não respondedores no início do tratamento estão sendo sugeridos e pesquisados em tecidos tumorais e/ou sangue periférico<sup>69</sup>.

Alguns estudos<sup>70, 71</sup> identificaram a expressão aumentada de PD-L1 nas células tumorais como o biomarcador mais comum para prever a resposta a ICI. Todavia, o uso deste marcador para prever resposta é limitado<sup>72, 73</sup>, pois independentemente do método empregado para avaliação da expressão de PD-L1, pacientes tratados com ICI apresentaram aumento na sobrevida de forma global, incluindo pacientes com baixa ou ausente expressão de PD-L1. Portanto, biomarcadores preditivos adicionais são necessários<sup>71</sup>.

Ayers e colaboradores<sup>68</sup> analisaram a expressão de um painel de genes, a partir de ácido ribonucleico (RNA) de células tumorais de pacientes tratados com pembrolizumabe, e identificaram assinaturas relacionadas ao sistema imunológico correlacionadas com o benefício clínico do tratamento. Hugo e colaboradores<sup>74</sup> associaram o enriquecimento de mutações no gene de reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA) *BRCA2* a uma melhor resposta à terapia anti-PD-1, enquanto tumores resistentes apresentaram uma assinatura transcricional, caracterizada pela superexpressão de genes nas vias de adesão celular, organização da matriz extracelular, cicatrização de feridas e angiogênese. Outro estudo<sup>75</sup> demonstrou que a carga mutacional global, a carga de neoantígenos e a expressão de marcadores citolíticos no microambiente tumoral foram significativamente associados à resposta em pacientes com melanoma avançado tratados com ipilimumabe. Goodman et al.<sup>76</sup> encontraram que tumores com alta carga mutacional, como o melanoma, são mais propensos a responder ao tratamento. Ainda, o índice de massa corporal (IMC) pode ser utilizado como preditor de resposta à imunoterapia, onde pacientes obesos com melanoma avançado respondem melhor, apresentando maior sobrevida global e livre de progressão após tratamento com ICIs quando comparados a pacientes não obesos<sup>77-79</sup>.

### **1.5 Imunoterapia no Brasil**

Assim como no cenário mundial, a imunoterapia tem ganhado espaço no Brasil. A aprovação do tratamento com mAbs anti-CTLA-4 (ipilimumabe), anti-PD-1 (nivolumabe e pembrolizumabe) e anti-LAG-3 (relatlimabe) pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) se deu, respectivamente, nos anos 2012, 2016 e 2023. Um levantamento realizado pelo nosso grupo, com pacientes da nossa instituição<sup>80</sup>, demonstrou que, dos pacientes com melanoma metastático diagnosticados entre 1996 e 2015, 67 foram submetidos a tratamento com ICIs, e que, juntamente com o tratamento com terapia alvo, a sobrevida em 5 anos destes pacientes tratados com imunoterapia foi superior à dos pacientes tratados com quimioterapia (34,2% vs. 20,0%), demonstrando o impacto da introdução destas novas terapias na sobrevida dos pacientes.

Ainda, a população brasileira possui algumas peculiaridades, principalmente por se tratar de uma população com alto grau de diversidade e heterogeneidade étnica (miscigenação entre ameríndios, europeus e africanos)<sup>81, 82</sup>. Em decorrência disso, a proporção de melanomas do tipo lentiginoso acral diagnosticados no país é maior do que

aquela encontrada em populações predominantemente de pele branca, que representa menos de 5% dos casos<sup>83, 84</sup>. Em estudo prévio do nosso grupo<sup>85</sup>, já demonstramos que, em uma população portadora de melanoma, 5,6% dos pacientes de pele branca apresentavam melanoma do subtipo acral, enquanto 18,5% dos pacientes de pele não-branca detinham este subtipo da doença. Vale ressaltar que os melanomas acrais são menos susceptíveis aos tratamentos com ICIs<sup>86</sup>, o que torna importante sua investigação.

Outro fato interessante por nós apresentado previamente relaciona-se às taxas de sobrevida por melanoma em 5 anos, onde a população brasileira apresentou 68,8% de sobrevida<sup>80</sup> contra cerca de 90% encontrada em países desenvolvidos. Novamente, isso pode estar relacionado às diferenças entre populações, como frequência dos subtipos histológicos<sup>84</sup> e espessura das lesões, sendo que na população brasileira há uma expressiva frequência de melanomas espessos (Breslow > 4.0 mm)<sup>80</sup>.

## 2 JUSTIFICATIVA

O conhecimento sobre o melanoma avançou consideravelmente nos últimos anos, permitindo o desenvolvimento de novas terapias inovadoras para tratamento dos pacientes com tumores avançados, como o uso de inibidores de *checkpoint* imunológico. Contudo, uma parcela dos pacientes não responde ou desenvolve resistência a esses tratamentos, havendo a necessidade de melhor compreensão dos mecanismos envolvidos e encontrar biomarcadores capazes de prever resposta. Apesar de já existirem relatos de biomarcadores de resposta em estudos pré-clínicos e clínicos, ainda não há na prática clínica um biomarcador acessível e suficientemente robusto para auxiliar o delineamento prognóstico, além do desenvolvimento de novos esquemas terapêuticos para o tratamento destes pacientes, de forma a contribuir para melhoras nas taxas de sobrevida e na qualidade de vida. Uma vez que a imunoterapia é dispendiosa, a busca por biomarcadores com suficiente valor preditivo negativo de resposta terapêutica torna-se estratégica para identificação de pacientes que não se beneficiarão deste tipo de tratamento, diminuindo as chances de privar os indivíduos que podem responder à terapia.

Acredita-se que a população brasileira apresente perfil de resposta e de interação dos fatores estudados diferente do restante do mundo, principalmente pela grande presença de melanomas lentiginosos acrais e perfil nutricional e de índice de massa corpórea distintos, ambos com impacto importante na evolução clínica e terapêutica dos melanomas. A caracterização do sistema imune dos pacientes tratados com inibidores de *checkpoint* imunológico no Hospital de Câncer de Barretos poderá guiar a expansão da imunoterapia para a população brasileira, permitindo o desenvolvimento de melhores estratégias para a identificação dos pacientes que se beneficiarão do tratamento e seu uso racional para uma futura inclusão no Sistema Único de Saúde (SUS).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Investigar marcadores moleculares associados à resistência primária às terapias com inibidores de *checkpoint* imunológico – anti-CTLA-4 e/ou anti-PD-1 – em portadores de melanoma avançado.

#### 3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a expressão de PD-L1 em 235 amostras tumorais incluídas em parafina;
2. Avaliar o perfil de citocinas presentes no plasma de 90 pacientes com melanoma tratados com imunoterapia;
3. Caracterizar o perfil de expressão de 579 genes relacionados a imunologia em 35 amostras tumorais incluídas em parafina;
4. Associar o perfil de PD-L1, de expressão gênica e das citocinas liberadas no plasma com a resposta destes pacientes à imunoterapia;
5. Associar o perfil de PD-L1, de expressão gênica e das citocinas liberadas no plasma com a sobrevida livre de progressão e a sobrevida global destes pacientes tratados com imunoterapia.

#### 3.3 Objetivo Exploratório

1. Avaliar os efeitos da inibição macrófago-específica do gene *GLUD1* no microambiente tumoral e na distrofia muscular. Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) sob supervisão do Dr. Massimiliano Mazzone, Laboratory of Tumor Inflammation and Angiogenesis – VIB, KU Leuven Center for Cancer Biology (CCB), Catholic University of Leuven – Leuven, Bélgica. Período: Mar/2022 a Fev/2023.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo observacional translacional com coleta retrospectiva de amostras e obtenção de dados.

### 4.2 Pacientes

Dados sobre pacientes com melanoma avançado – estadio clínico (EC) III irressecável ou EC IV, que realizaram tratamento imunoterápico com anti-PD-1 e/ou anti-CTLA-4 no Departamento de Cirurgia de Melanoma, Sarcoma e Tumores Mesenquimais do Hospital de Câncer de Barretos (HCB) – Fundação Pio XII no período de 2011 a 2021 foram coletados dos sistemas de gerenciamento de dados SISONCO e TASY. Neste período, 269 pacientes foram submetidos às terapias anti-PD-1 e/ou anti-CTLA-4. Destes, foram selecionados, por conveniência, 238 pacientes para as análises moleculares. Apesar da não disponibilidade destes medicamentos no SUS, sua aquisição é possível por meio de ação judicial, pesquisa clínica realizada pela própria instituição, doações feitas por terceiros, convênio médico ou via particular.

Foram levantados, em prontuário, dados epidemiológicos (sexo, idade, cor da pele), clínicos (sub-localização anatômica, estadiamento TNM, comorbidades, tratamentos realizados) e de anatomia-patológica (índice de Breslow, presença de ulceração, número de mitoses por mm<sup>2</sup>, presença de infiltrado inflamatório intra- e peritumoral de forma qualitativa).

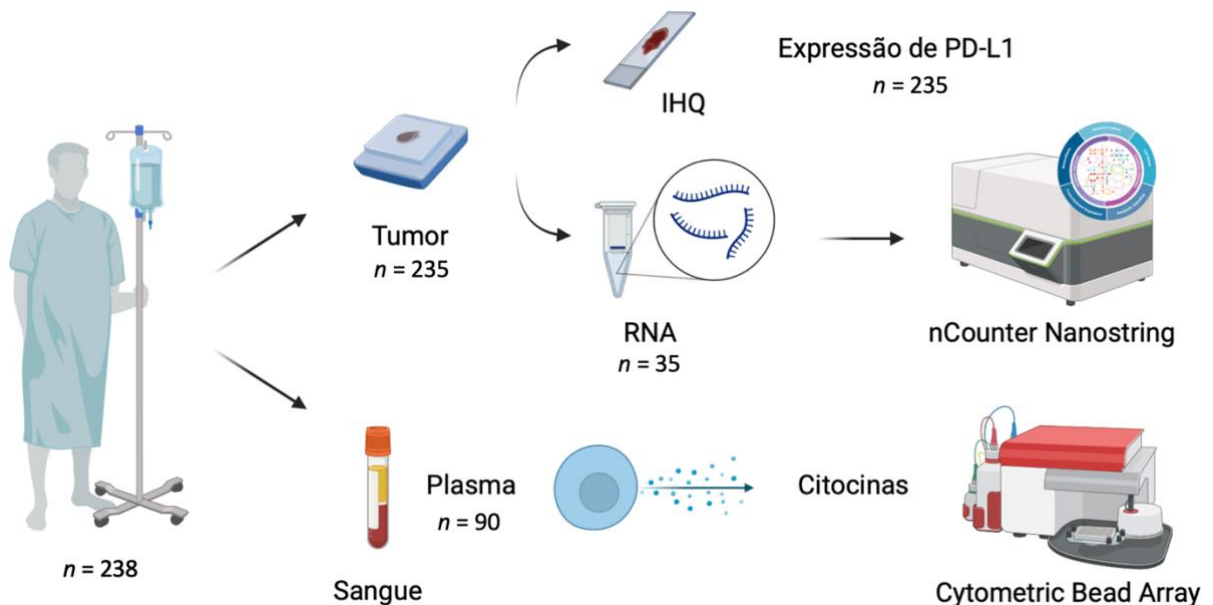
A resposta clínica foi avaliada por oncologistas clínicos e radiologistas através dos critérios para avaliação de resposta à imunoterapia em tumores sólidos (iRECIST)<sup>87</sup>, categorizando inicialmente os pacientes em progressão de doença (PD), doença estável (DE), resposta parcial (RP) e resposta completa (RC). Para fins de análise comparativa, os pacientes foram classificados como não respondedores (PD) ou respondedores (DE por no mínimo 6 meses, RP e RC). Por fim, foram calculadas sobrevida livre de progressão e sobrevida global, ambas calculadas após o início do tratamento imunoterápico.

Os critérios de inclusão para este projeto foram: portadores de melanoma localmente avançado (EC III) ou disseminado (EC IV) tratados com inibidores de *checkpoint* imunológico (anti-CTLA-4 ou anti-PD-1). Foram excluídos pacientes que não realizaram tratamento no HCB,

que não tiveram avaliação radiológica ou clínica de resposta e pacientes sem amostras biológicas disponíveis para as análises moleculares.

### 4.3 Coleta de amostras biológicas

O material analisado neste estudo consiste em amostras de tecido tumoral parafinado e amostras de plasma, que foram utilizadas de acordo com cada objetivo específico (**Figura 3**). Todas as amostras de tecido foram coletadas antes da cirurgia, e, conseqüentemente, antes de qualquer tratamento sistêmico. Já as amostras de plasma foram coletadas pré-tratamento imunoterápico. Os testes moleculares foram realizados no Centro Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do HCB.



**Fonte:** Criado com o Biorender.

**Figura 3** - Fluxograma de disponibilidade de amostras de tecido tumoral parafinado e sangue periférico para as análises moleculares do estudo. IHQ: imuno-histoquímica.

### 4.4 Reações de PD-L1 por imuno-histoquímica

Após a ressecção de um melanoma, rotineiramente a peça cirúrgica é encaminhada para análise anatomopatológica com confecção dos blocos de parafina e lâminas de hematoxilina e eosina (H&E). Os blocos são armazenados nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do HCB.

Para os 235 casos de pacientes submetidos à imunoterapia com ICI na instituição com amostras de tecido tumoral fixado em formalina e embebido em parafina (FFPE, do inglês *formalin-fixed paraffin-embedded*) disponíveis, as áreas tumorais mais representativas dos blocos de parafina foram selecionadas para análise da expressão de PD-L1. Foram realizados cortes de 3 µm para montagem das lâminas e posterior análise por imuno-histoquímica da expressão deste marcador. Um mínimo de 100 células tumorais viáveis na lâmina é necessário para uma avaliação adequada de PD-L1.

A reação foi realizada utilizando-se a plataforma Benchmark ULTRA e utilizando o anticorpo monoclonal de coelhos anti-PD-L1 (clone E1L3N) da Cell Signaling Technology para detecção da proteína PD-L1 em tecidos tumorais, utilizando o sistema de visualização Optiview DAB. O processo foi realizado conforme especificações do fabricante.

A avaliação das lâminas foi realizada com auxílio de microscópio óptico por um patologista com treinamento especializado para avaliação da expressão de PD-L1. A expressão deste foi determinada através de dois índices: o *Tumor Proportion Score* (TPS) e o *Combined Positive Score* (CPS). O TPS avalia a porcentagem de células tumorais viáveis que apresentam coloração parcial ou completa da membrana em qualquer intensidade. Esse índice varia de 0-100% e foi predefinido como positivo se detectado em pelo menos 1% das células tumorais viáveis. O CPS avalia o número total de células coradas PD-L1 positivas (células tumorais e células do sistema imune – linfócitos, macrófagos) em relação ao número total de células tumorais viáveis na lâmina. Este índice varia de 0 a 100, e foi considerado positivo quando maior ou igual a 1.

#### **4.5 Análise dos níveis de citocinas presentes no plasma**

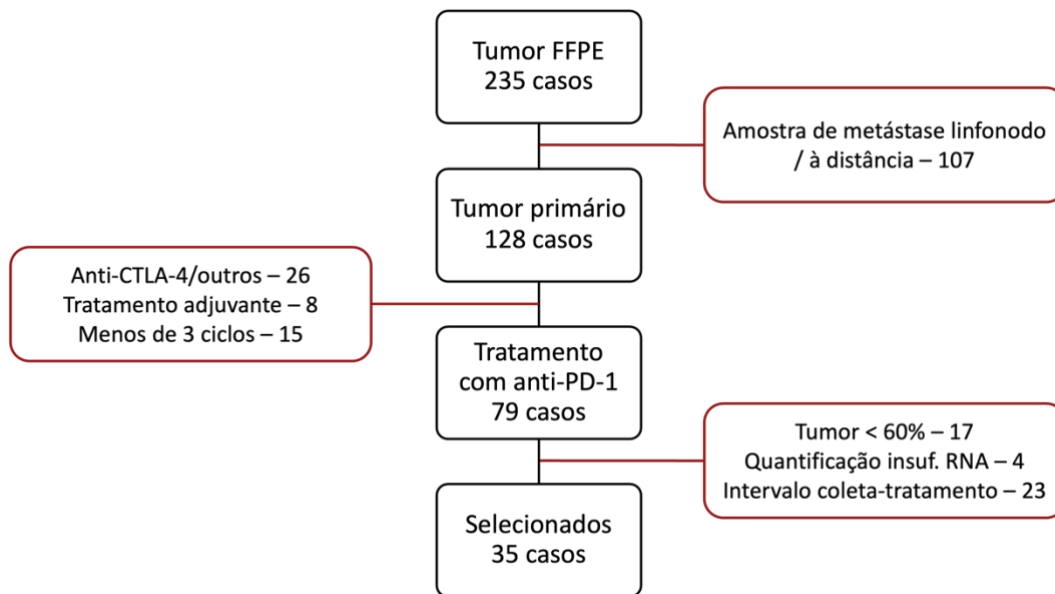
O plasma dos pacientes foi obtido através do sangue periférico total. Este material é rotineiramente coletado para pesquisa e armazenado no Biobanco da instituição. Todas as amostras selecionadas foram coletadas previamente ao início do tratamento com ICIs. A separação foi realizada por centrifugação, a 3500 rpm por 10 minutos, e o material foi congelado em alíquotas a -80°C até sua utilização.

As citocinas presentes no plasma de 90 pacientes com melanoma avançado tratados com imunoterapia foram avaliadas utilizando-se a técnica de Cytometric Beads Array (CBA) com o painel CBA - Human Th1/Th2/Th17 CBA Kit (*BD Biosciences*), conforme instruções do fabricante. Através de beads, tal metodologia possibilita a identificação de citocinas expressas

por linfócitos padrão Th1, Th2 e Th17, incluindo as interleucinas (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, o fator de necrose tumoral (TNF) e o interferon (IFN)- $\gamma$ . Após devida marcação, as análises imunofenotípicas foram realizadas em citômetro de fluxo BD C6 Accuri (*BD BioSciences*) e os dados foram analisados utilizando-se o CBA Analysis software (*BD BioSciences*).

#### 4.6 Painel de expressão gênica – NanoString

Para seleção das amostras para a análise de expressão gênica, foram utilizados os seguintes critérios adicionais ao estudo: pacientes com melanoma avançado tratados de forma paliativa com pelo menos 3 ciclos de terapia baseada em inibidores de PD-1, em monoterapia, com amostras de tumor primário disponíveis. Amostras com menos de 60% de área tumoral, com quantificação insuficiente de RNA e coletadas há mais de 24 meses do início do tratamento imunoterápico foram excluídas, restando 35 amostras para avaliação nesta etapa (**Figura 4**).



**Figura 4** - Critérios de seleção das amostras de tumor incluídas na análise de expressão gênica pelo painel *NanoString nCounter® Immunology V2*. Quadros em vermelho representam o motivo e a quantidade de amostras que foram retiradas do estudo. FFPE: *formalin fixed paraffin embedded*; insuf.: insuficiente.

A expressão de 579 genes imunes e 15 genes de referência foi avaliada em amostras de pacientes com melanoma avançado utilizando-se o *NanoString nCounter® Immunology V2 Panel* (Nanostring Technologies, Seattle, WA, USA), a partir de 250ng de RNA proveniente de

tecido tumoral. Este painel abrange genes relacionados a diversas funções imunológicas, incluindo moléculas envolvidas na sinalização celular, respostas inflamatórias e modulação da atividade imune.

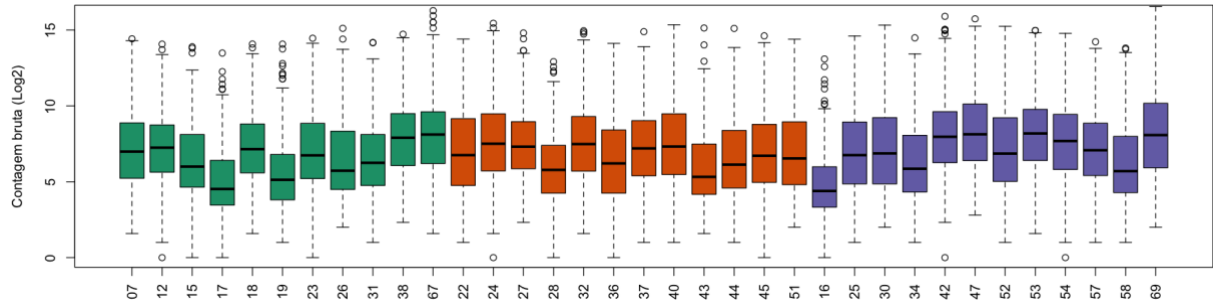
A partir de 5 cortes de 10 micra de cada bloco de tumor incluído em parafina, lâminas foram preparadas, coradas com H&E e tiveram sua área tumoral delimitada por um patologista para extração de RNA, utilizando-se o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) segundo instruções do fabricante.

A tecnologia nCounter da NanoString (NanoString Technologies, Seattle, EUA) baseia-se na detecção de um código de barras digital codificado por cores que permite medir a expressão gênica a partir de baixas concentrações de RNA mensageiro com alta precisão e sensibilidade<sup>88</sup>, onde cada código de barras corresponde a uma sonda de hibridização específica para um gene alvo de interesse. O ensaio possui três etapas principais: hibridização a um par de sondas específicas para cada alvo; purificação e imobilização das amostras no cartucho do contador; e contagem e análise para coleta de dados utilizando-se o nCounter Digital Analyzer<sup>89</sup>. Todos os cartuchos foram escaneados utilizando-se 555 focos de visão (FOVs). Esta técnica é capaz de detectar fragmentos pequenos provenientes de amostras com alto grau de degradação, como amostras derivadas de tecido parafinado, e não necessita validação por outro método.

Os resultados foram captados e analisados pelo nSolver Analysis Software v4.0 (*NanoString Technologies*) utilizando o módulo *Advanced Analysis* em ambiente estatístico-matemático R (R-project v3.2.1; The R Foundation, Viena, Áustria). A análise foi realizada seguindo as recomendações do fornecedor. O processo inicia com o controle de qualidade, que avalia a qualidade da imagem, a densidade de ligação, a linearidade dos controles positivos e o limite de detecção do ensaio. Em seguida, são realizadas etapas de normalização e remoção de ruído, considerando a variabilidade técnica, a variabilidade da quantidade inicial de RNA e a normalização com base em genes de referência. A análise de expressão diferencial é conduzida, levando em conta variáveis do estudo, desenho experimental, valores atípicos e possíveis confundidores. Por fim, são conduzidas análises para a contextualização dos resultados, abrangendo o enriquecimento de vias biológicas e a validação dos alvos identificados.

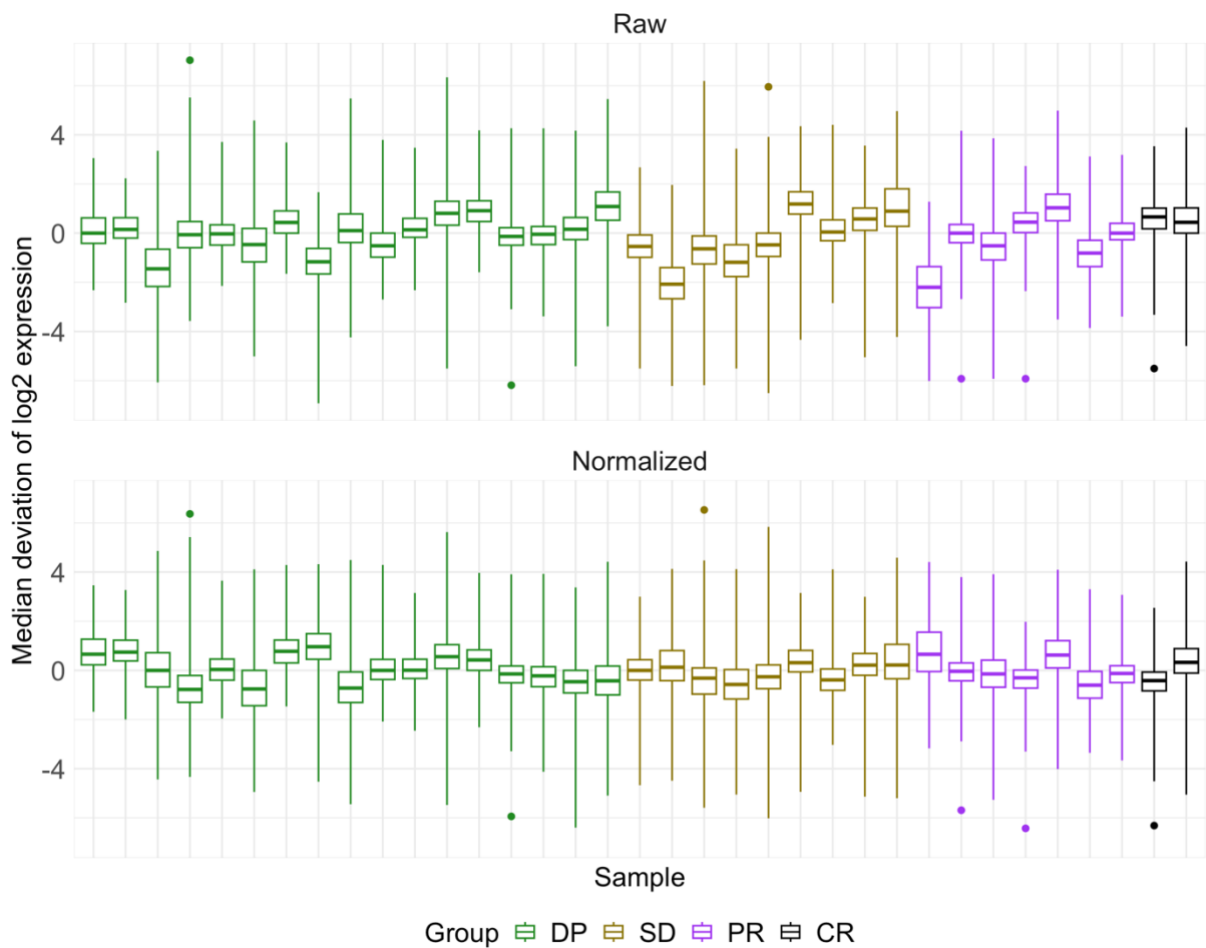
Após leitura dos cartuchos, as amostras passaram por uma primeira análise de controle de qualidade, onde foi avaliado o desempenho geral do ensaio através dos controles positivos

e negativos presentes no painel. Nenhuma das amostras apresentou problemas quanto aos parâmetros técnicos do ensaio (**Figura 5**).



**Figura 5** - Distribuição da contagem bruta (em Log2) dos 579 genes avaliados no painel de expressão gênica, para cada paciente ( $n = 35$ ). Cada boxplot representa um paciente. As cores representam os 3 diferentes cartuchos utilizados no experimento.

Após a análise de controle de qualidade da reação, foram excluídos os genes com contagem inferior ao limite de detecção do ensaio (neste caso, contagem inferior a 20) para todos os pacientes, restando 567 alvos para normalização dos dados de contagem. Para esta etapa, foi utilizada a razão entre a média geométrica de 14 genes de referência para cada amostra e a média aritmética das médias geométricas de todas as amostras. Assim, um fator de normalização específico para cada amostra foi calculado e as contagens de todos os alvos do painel foram multiplicadas por este fator para os respectivos pacientes. Na **Figura 6** é possível observar a mediana de variação da expressão do conjunto de genes alvo para cada paciente, antes e após a normalização. A seleção dos 14 genes de referência foi feita baseada nos genes mais estáveis no conjunto de amostras, utilizando-se o algoritmo geNorm<sup>90</sup>.



**Figura 6** - Mediana de variação da expressão dos 567 genes alvo para cada um dos 35 pacientes incluídos na análise de expressão gênica, antes e após a normalização por genes de referência. As amostras estão classificadas quanto à resposta ao tratamento imunoterápico, segundo critérios do iRECIST. DP: progressão de doença; SD: doença estável; PR: resposta parcial; CR: resposta completa.

A análise de expressão gênica diferencial entre os grupos de resposta à imunoterapia (pacientes respondedores vs. não-respondedores) foram realizadas, considerando como variáveis confundidoras idade e sexo. Um valor de *fold change*  $\geq 1,5$  ou  $\leq -1,5$  e um  $p < 0,05$  foram adotados. Após a identificação de alvos diferencialmente expressos entre os grupos, análises de enriquecimento de processos biológicos utilizando-se uma hiper-representação através do algoritmo clusterProfiler<sup>91</sup> e o banco de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG)<sup>92</sup> foram realizadas.

Para propor a assinatura gênica para a resposta anti-PD-1, os genes diferencialmente expressos foram avaliados na análise multivariada com a aplicação do método de regressão logística com seleção condicional passo a passo (*forward stepwise*). Para entrada e remoção

de dados, foram usados valores de  $p$  de 0,1 e 0,2, respectivamente. Uma pontuação foi proposta com base na soma da multiplicação do coeficiente da regressão ( $\beta$ ) e da expressão absoluta do gene ( $X$ ), conforme mostrado abaixo:

$$\text{Pontuação gênica} = (\beta_1 * X_1) + (\beta_2 * X_2) + \dots + (\beta_n * X_n)$$

A análise da característica operacional do receptor (ROC) foi usada para avaliar o valor preditivo da pontuação proposta. Essa análise também foi realizada para cada gene, separadamente. Um valor de corte foi definido para a pontuação do gene e para os genes individuais usando a ferramenta da web Cutoff Finder<sup>93</sup>. Foi aplicado o método da curva ROC com a distância de Manhattan. Os casos foram classificados como baixo e alto de acordo com o ponto de corte definido.

#### 4.7 Validação da assinatura gênica

Para validar a assinatura gênica proposta, os dados de sequenciamento de RNA (RNA-seq) de duas coortes independentes foram acessados no banco de dados Gene Expression Omnibus (GEO) - Coorte 1: GSE91061<sup>94</sup> e Coorte 2: GSE78220<sup>95</sup>. Foram usados somente dados de amostras de tumor antes do tratamento com anti-PD-1. Os casos com histórico de tratamento com a proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (anti-CTLA-4) foram excluídos.

Foram coletados os dados de fragmentos por quilobase de transcrição por milhão de leituras mapeadas (FKPM) dos genes-alvo, a resposta ao tratamento anti-PD-1 e os respectivos dados de sobrevivência. A mesma metodologia para o cálculo da assinatura do gene foi empregada em ambas as coortes, conforme relatado na seção anterior.

#### 4.8 Análise de associação com dados clínico-patológicos

Os resultados moleculares encontrados foram associados aos dados clínicos e patológicos dos pacientes utilizando-se o programa estatístico SPSS 23.0 e o ambiente de programação R v 4.2.0. Para as análises de resposta ao tratamento, pacientes foram divididos em respondedores (DE, RP ou RC) e não-respondedores (PD).

Foram utilizados os testes de qui-quadrado ou exato de Fisher para verificar a associação entre as variáveis categóricas de interesse. A significância das diferenças em cada conjunto de dados entre dois grupos nas variáveis contínuas foi avaliada usando o teste t de *Student* ou o

teste não paramétrico Mann-Whitney. As taxas de sobrevivência foram avaliadas pelo método de Kaplan-Meier e as curvas comparadas usando o teste log-rank.

Análises multivariadas foram realizadas com o método de regressão de Cox ou regressão logística binária para variáveis com valor de  $p < 0,1$  na análise univariada ou consideradas de ajuste no modelo multivariado. A significância estatística foi determinada para um valor de  $p < 0,05$  para todas as análises.

#### **4.9 Aspectos éticos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos (HCB) – Fundação Pio XII sob o número 1772/2019 (**Anexo A**).

Este estudo, de caráter retrospectivo, envolveu a análise de amostras armazenadas em blocos de parafina e dados secundários obtidos de prontuários médicos, o que justificou a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A decisão foi baseada em dois aspectos principais: (i) a inclusão de pacientes com tumores em estágio avançado e/ou que faleceram, cenário que impossibilita ou dificulta significativamente o contato para obtenção de consentimento adicional; e (ii) a ausência de interferência no manejo clínico dos participantes ou na necessidade de aconselhamento genético durante a pesquisa.

Quanto aos riscos, o estudo apresentou riscos mínimos aos pacientes, restritos à possibilidade de exposição acidental de dados confidenciais. Para mitigar esse risco, os pesquisadores adotaram protocolos rigorosos de proteção à privacidade, garantindo que as informações coletadas fossem utilizadas exclusivamente para os objetivos do projeto. Adicionalmente, os dados foram anonimizados, garantindo que a identificação direta ou indireta dos participantes não seja possível em quaisquer publicações ou divulgações derivadas do estudo.

#### **4.10 Inibição de GLUD1 em macrófagos (KU Leuven, Bélgica)**

Em colaboração com o Dr. Massimiliano Mazzone, da Catholic University of Leuven (KU Leuven) – Leuven, Bélgica, realizei um estágio de pesquisa no exterior (BEPE-FAPESP, processo nº 2021/10922-9) com duração de 12 meses. adquiri expertise em diversas técnicas avançadas, tais como injeções ortotópicas *in vivo*, processamento de amostras de sangue e tecido tumoral, imunofluorescência, produção e transdução de lentivírus, metabólica, isolamento de células mononucleares de sangue periférico por gradiente de Ficoll, isolamento

de células imunes por *beads* magnéticas, além de protocolos de estimulação *in vitro* e citometria de fluxo. Essas competências foram essenciais para o desenvolvimento do projeto durante minha estadia no exterior e serão de grande relevância para os futuros projetos do grupo de imuno-oncologia do HCB.

No laboratório do Dr. Mazzone, participei ativamente de um projeto focado na avaliação dos efeitos da inibição genética e farmacológica da enzima glutamato desidrogenase-1 (GLUD1) em macrófagos, investigando seu impacto no microambiente tumoral e na degeneração muscular. Os resultados desse estudo foram submetidos para publicação em periódico internacional *The American Journal of Pathology* (**Anexo B**).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Dados clínico-patológicos

Como mencionado anteriormente, dados sobre pacientes com melanoma submetidos à imunoterapia no HCB no período de 2011 a 2021 foram coletados dos sistemas de gerenciamento de dados da instituição. Dos 269 pacientes submetidos às terapias com anti-PD-1 e/ou anti-CTLA-4, 238 possuíam amostras disponíveis para as análises propostas neste estudo e, portanto, foram incluídos.

As características clínicas, anatomopatológicas e de tratamento dos pacientes estão demonstradas na **Tabela 1**. A idade média ao diagnóstico foi de 53 anos (variando de 19 a 91 anos). Cinquenta e oito por cento dos pacientes eram do sexo masculino. O principal local de acometimento do tumor primário foi os membros inferiores (30,3%), seguido pelo tronco (21,8%). Em relação ao tratamento, 81,5% dos pacientes fizeram uso de agentes anti-PD-1 em monoterapia, especialmente com o uso de Nivolumabe. A sobrevida global dos pacientes após o início da imunoterapia foi de 36,3% em 5 anos, com uma mediana de 18 meses (intervalo de confiança de 95%: 13,9 – 24,2 meses; **Figura 7**).

**Tabela 1** - Características clínico-patológicas e de tratamento dos 238 pacientes com melanoma avançado tratados com imunoterapia no Hospital de Câncer de Barretos no período de 2011 a 2021.

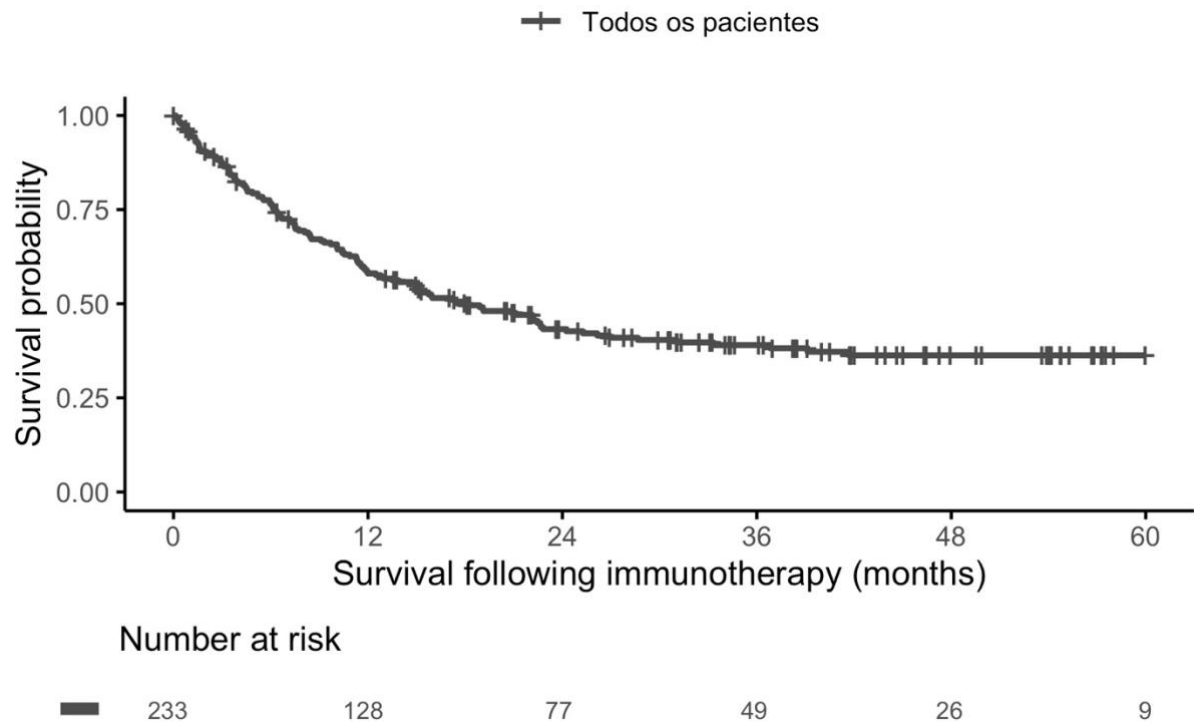
Característica	n = 238	Porcentagem (%)
<b>Sexo</b>		
Masculino	138	58,0
Feminino	100	42,0
<b>Cor da pele</b>		
Branco	203	85,3
Não branco	35	14,7
<b>Localização da lesão</b>		
Membros inferiores	72	30,3
Tronco	52	21,8
Cabeça e pescoço	47	19,7
Membros superiores	24	10,1
Outro	10	4,2
Primário desconhecido	33	13,9
<b>Tipo histológico</b>		
Nodular	62	26,1
Extensivo superficial	51	21,4
Lentiginoso acral	49	20,6
Outros	23	9,7
Não classificável	53	22,3

(continua na próxima página...)

**Tabela 1 (continuação)** - Características clínico-patológicas e de tratamento dos 238 pacientes com melanoma avançado tratados com imunoterapia no Hospital de Câncer de Barretos no período de 2011 a 2021.

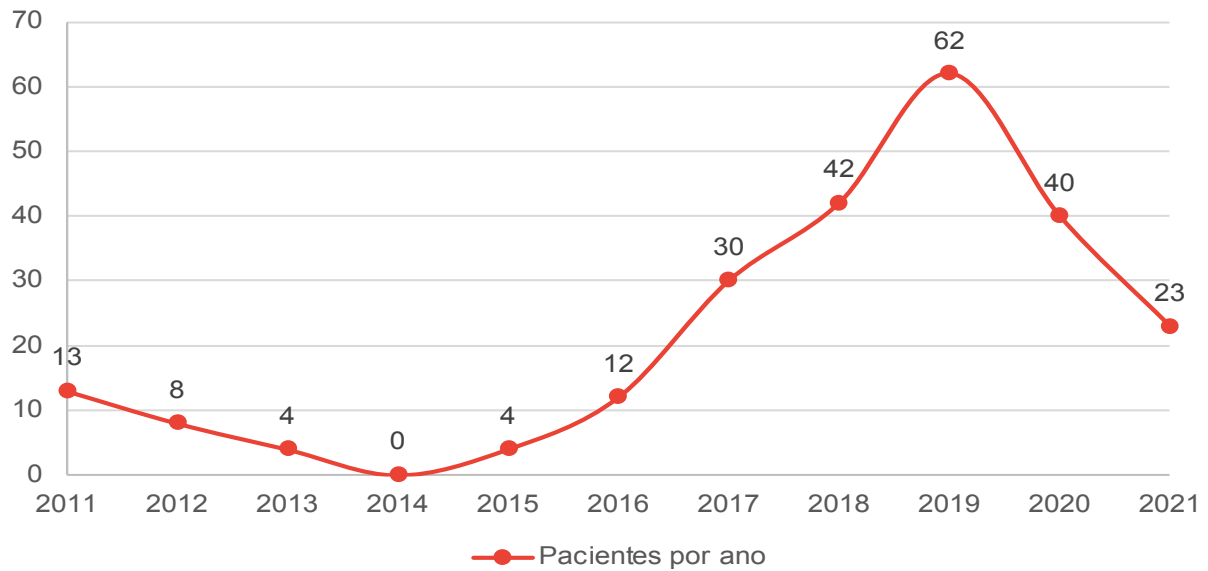
<b>Característica</b>	<b>n = 238</b>	<b>Porcentagem (%)</b>
<b>Mutação <i>BRAF</i> V600</b>		
Mutado	84	35,3
Selvagem	116	48,7
Não realizou teste	38	16,0
<b>Mutação <i>NRAS</i></b>		
Mutado	10	4,2
Selvagem	75	31,5
Não realizou teste	153	64,3
<b>Medicamento</b>		
Nivolumabe (anti-PD-1)	131	55,0
Pembrolizumabe (anti-PD-1)	63	26,5
Ipilimumabe (anti-CTLA-4)	31	13,0
Nivolumabe + NKTR-214 (agonista da via de IL-2)	10	4,2
Nivolumabe + ipilimumabe	3	1,3
<b>Linha de tratamento</b>		
Primeira	134	56,3
Segunda	71	29,8
Maior ou igual a terceira	33	13,9
<b>Ciclos de terapia</b>		
<3	41	17,2
3-9	98	41,2
≥10	83	34,9
Desconhecido	16	6,7
<b>Resposta ao tratamento</b>		
Progressão de doença (PD)	122	51,3
Doença estável (DE)	44	18,5
Resposta parcial (RP)	34	14,3
Resposta completa (RC)	13	5,5
Tratamento adjuvante = SEDO	25	10,5
<b>Intervalo entre coleta da amostra e tratamento com ICI, em meses</b>		
Amostras tumorais, mediana (mínimo – máximo)	21,5 (1,3 – 202,3)	
Amostras de plasma, mediana (mínimo – máximo)	7,1 (0,0 – 65,9)	

SEDO: Sem evidência de doença; ICI: inibidores de *checkpoint* imune.



**Figura 7** - Sobrevida pós imunoterapia de 233 pacientes com melanoma tratados com imunoterapia no Hospital de Câncer de Barretos entre 2011 e 2021. A mediana de sobrevida observada foi de 18 meses. Cinco pacientes foram excluídos da análise devido à ausência de informações de seguimento.

Durante o período do estudo, observou-se um aumento nas solicitações de imunoterapia (**Figura 8**), sendo 2019 o ano com mais pacientes iniciando tratamento com essa modalidade terapêutica no HCB. Entretanto, houve uma queda no número de pacientes iniciando tratamento com ICIs em 2020, onde 27,9% (12/43) destes foram incluídos em ensaios clínicos pela Unidade de Pesquisa Clínica do hospital. Essa queda nos últimos ano se deu provavelmente ao impacto da pandemia do SARS-CoV-2 no nosso sistema único de saúde, o que dificultou ainda mais o acesso à essa medicação de alto custo.



**Figura 8** - Distribuição anual de 238 pacientes com melanoma avançado tratados com inibidores de *checkpoint* imunológico no Hospital de Câncer de Barretos entre 2011 e 2021.

## 5.2 Avaliação de PD-L1 no tumor

Relacionado às análises de PD-L1, o levantamento de todos os blocos e lâminas de parafina dos pacientes foi realizado. Dos 238 pacientes do estudo, 3 (1,3%) pacientes não possuíam tecido tumoral parafinado para esta etapa, restando 235 pacientes para análise de expressão proteica de PD-L1 por imuno-histoquímica. Além disso, 25 pacientes receberam tratamento com ICI como terapia adjuvante, isto é, sem evidência de doença ativa durante o tratamento, e, portanto, foram excluídos da análise. Os dados relacionados a esses pacientes tratados de forma adjuvante no hospital serão examinados posteriormente pelo grupo. Assim, os resultados apresentados aqui são baseados em 210 pacientes submetidos à imunoterapia em um contexto paliativo e foram publicados na revista *Diagnostics* em março de 2023 (ANEXO C)<sup>96</sup>.

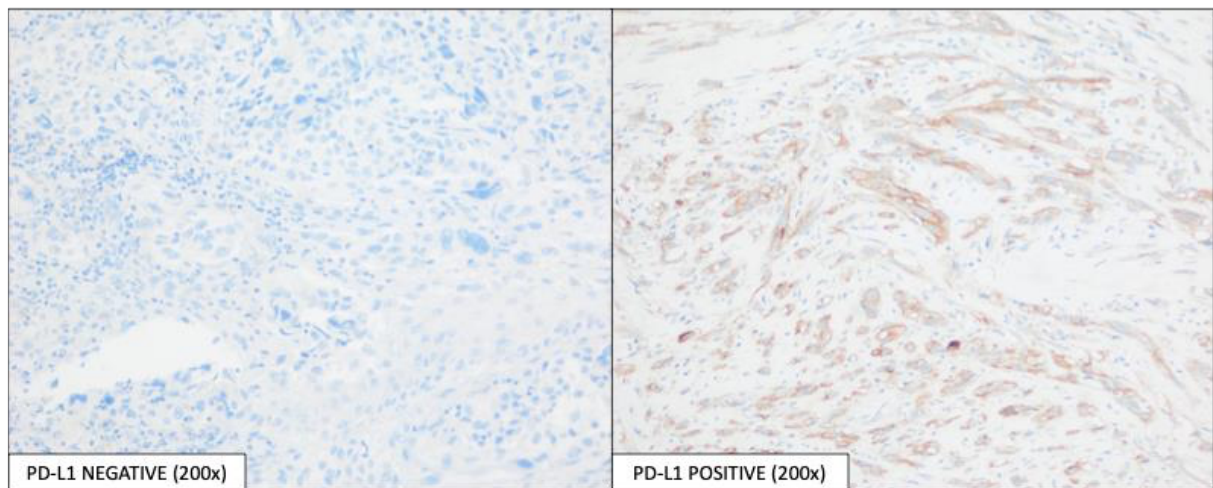
Todos os 210 pacientes foram submetidos à análise de expressão de PD-L1. A origem das amostras analisadas dependeu da disponibilidade de blocos de FFPE no Departamento de Patologia do hospital. Aproximadamente 54% dos pacientes possuíam amostra de tumor primário armazenada, enquanto os demais pacientes possuíam amostras de tecido tumoral metastático disponíveis, sendo estas provenientes de nódulos subcutâneos, linfonodos ou outros órgãos distantes (Tabela 2).

**Tabela 2** - Disponibilidade e origem das amostras de tecido tumoral incluídas em parafina de 210 pacientes com melanoma do Hospital de Câncer de Barretos para análise de expressão de PD-L1 por imuno-histoquímica.

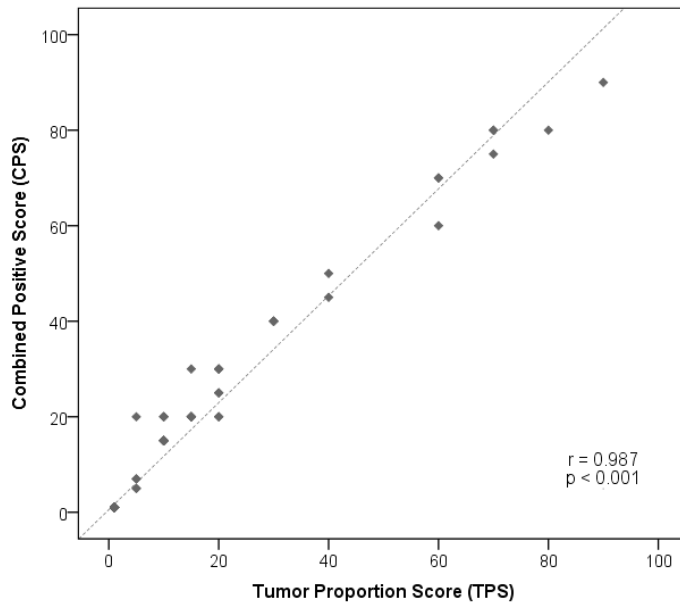
Tipo de amostra disponível (FFPE)	Pacientes (n)	%
Tumor primário	113	53,8
Metástase subcutânea	59	28,1
Metástase linfonodal	21	10,0
Metástase outros órgãos	17	8,1

FFPE: *formalin-fixed paraffin-embedded*

Todas as amostras foram separadas e as lâminas mais representativas de tumor foram selecionadas e coradas para PD-L1 por imuno-histoquímica, com auxílio da patologista Dra. Lara Santana. A avaliação da expressão deste marcador foi realizada utilizando-se os dois scores (TPS e CPS), sendo que 44 (21,0%) amostras foram consideradas positivas, com expressão de PD-L1 superior a 1%, enquanto 166 (79,0%) amostras foram consideradas negativas (**Figura 9**). Uma correlação positiva entre os dois scores foi encontrada (correlação de Pearson = 0.987,  $p < 0,001$ , **Figura 10**).



**Figura 9** - Detecção de PD-L1 por imuno-histoquímica utilizando o anticorpo E1L3N. As imagens foram obtidas por microscopia óptica com magnificação original de 200x. A figura apresenta exemplos representativos de expressão de PD-L1 negativa e positiva.



**Figura 10** - Análise de correlação de Pearson entre o *Tumor Proportion Score* (TPS) e o *Combined Positive Score* (CPS) na avaliação da expressão de PD-L1 em amostras de pacientes com melanoma avançado.

As características clínicas dos pacientes e as características moleculares das amostras tumorais foram avaliadas como preditores de resposta ao tratamento com ICI. Os pacientes foram classificados em dois grupos, respondedores e não respondedores, compreendendo 83 e 127 pacientes, respectivamente.

Encontramos que a expressão de PD-L1 inferior a 1% nas células tumorais e imunes, a linha de tratamento imunoterapêutico diferente da primeira linha, o subtipo histológico lentiginoso acral e o tratamento com anti-CTLA-4 em monoterapia estavam associados a piores respostas ao tratamento (**Tabela 3**).

**Tabela 3** - Características clínico-patológicas e de tratamento dos 210 pacientes com melanoma avançado tratados com inibidores de *checkpoint* imunológico, estratificados por grupos de resposta à terapia.

Característica	Categoria	Todos	Respondedores	Não-respondedores	<i>p</i>
		<i>n</i> = 210 (%)	<i>n</i> = 83 (%)	<i>n</i> = 127 (%)	
<b>Sexo</b>	Masculino	123 (58,6)	47 (56,6)	76 (59,8)	0,669
	Feminino	87 (41,4)	36 (43,4)	51 (40,2)	
<b>Subtipo histológico</b>	Nodular	38 (18,1)	15 (18,1)	23 (18,1)	<b>0,020</b>
	Lentiginoso acral	37 (17,6)	11 (13,3)	26 (20,5)	
	Extensivo superficial	31 (14,8)	20 (24,1)	11 (8,7)	
	Outros	22 (10,5)	7 (8,4)	15 (11,8)	
	<i>Missing</i>	82 (39,0)	30 (36,1)	52 (40,9)	

(continua na próxima página...)

**Tabela 3 (continuação)** - Características clínico-patológicas e de tratamento dos 210 pacientes com melanoma avançado tratados com inibidores de *checkpoint* imunológico, estratificados por grupos de resposta à terapia.

Característica	Categoria	Todos <i>n</i> = 210 (%)	Respondedores <i>n</i> = 83 (%)	Não-respondedores <i>n</i> = 127 (%)	<i>p</i>
<b>Localização tumor primário</b>	Membros inferiores	66 (31,4)	20 (24,1)	46 (36,2)	0,245
	Tronco	45 (21,4)	23 (27,7)	22 (17,3)	
	Cabeça e pescoço	39 (18,6)	15 (18,1)	24 (18,9)	
	Membros superiores	22 (10,5)	10 (12,0)	12 (9,4)	
	Outros	9 (4,3)	2 (2,4)	7 (5,5)	
	Primário oculto	29 (13,8)	13 (15,7)	16 (12,6)	
<b>Estadiamento pré-III imunoterapia</b>	irressecável	9 (4,3)	2 (2,4)	7 (5,5)	0,249
	IV (M1A)	32 (15,2)	10 (12,0)	22 (17,3)	
	IV (M1B)	52 (24,8)	26 (31,3)	26 (20,4)	
	IV (M1C)	58 (27,6)	20 (24,1)	38 (29,9)	
	IV (M1D)	36 (17,1)	12 (14,5)	24 (18,9)	
	<i>Missing</i>	23 (11,0)	13 (15,7)	10 (7,9)	
<b>BRAF status</b>	V600 mutado	77 (36,7)	38 (45,8)	39 (30,7)	0,132
	Selvagem	106 (50,5)	40 (48,2)	66 (52,0)	
	<i>Missing</i>	27 (12,9)	5 (6,0)	22 (17,3)	
<b>NRAS status</b>	Mutado	10 (4,8)	2 (2,4)	8 (6,3)	0,094
	Selvagem	67 (31,9)	34 (41,0)	33 (26,0)	
	<i>Missing</i>	134 (63,3)	47 (56,6)	86 (67,7)	
<b>Droga do tratamento</b>	Anti-PD1	172 (81,9)	73 (88,0)	135 (81,8)	<b>0,009</b>
	Anti-CTLA-4	28 (13,3)	4 (4,8)	24 (18,9)	
	Anti-PD-1 + IL-2 agonista	8 (3,8)	4 (4,8)	4 (3,1)	
	Anti-PD-1 + anti-CTLA-4	2 (1,0)	2 (2,4)	0 (0,0)	
<b>Linha de tratamento da imunoterapia</b>	Primeira	113 (53,8)	56 (67,5)	57 (44,9)	<b>0,001</b>
	Segunda	67 (31,9)	23 (27,7)	44 (34,6)	
	Igual ou maior que a terceira	30 (14,3)	4 (4,8)	26 (20,5)	
<b>Resposta ao tratamento</b>	Progressão de doença (PD)	127 (60,5)	-	127 (100,0)	-
	Doença estável (DE)	34 (16,2)	34 (41,0)	-	
	Resposta parcial (RP)	36 (17,1)	36 (43,4)	-	
	Resposta completa (RC)	13 (6,2)	13 (15,7)	-	
<b>Expressão de PD-L1</b>	Negativa ( $\leq 1\%$ )	166 (79,0)	57 (68,7)	109 (85,8)	<b>0,005</b>
	Positiva ( $> 1\%$ )	44 (21,0)	26 (31,3)	18 (14,2)	

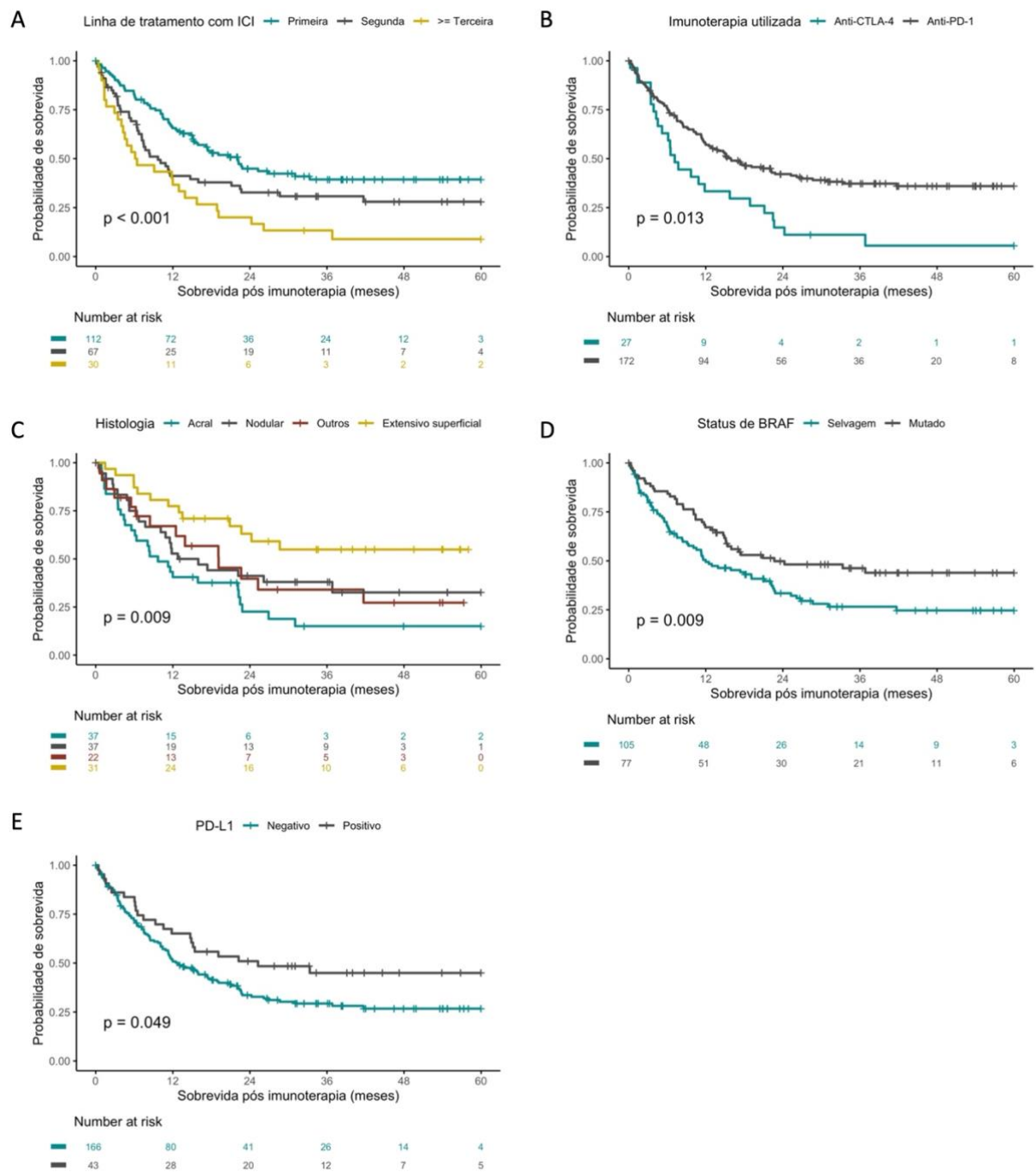
Em seguida, as variáveis status de mutação *BRAF*, droga utilizada no tratamento com ICI, linha de tratamento com ICI e expressão de PD-L1 foram incluídas na análise de regressão logística multivariada. A expressão de PD-L1 ( $p = 0,010$ ) e a linha de tratamento que a ICI foi utilizada ( $p = 0,002$ ) permaneceram como variáveis independentes no modelo (**Tabela 4**).

**Tabela 4** - Análises univariada e multivariada para avaliação do impacto das características clínicas e moleculares na falha de resposta terapêutica em pacientes com melanoma avançado tratados com inibidores de *checkpoint* imune.

Característica	Categoria	Análise Univariada <i>p</i>	Razão de risco (95% IC)	Análise Multivariada <i>p</i>
<i>BRAF</i> status	V600 mutado		Referência	
	Selvagem	0,132	1,30 (0,69–2,44)	0,420
<i>Missing</i> = 27				
Droga do tratamento	Anti-PD1		Referência	
	Anti-CTLA-4		0,712 (0,179–2,824)	0,629
	Anti-PD-1 + Anti-CTLA-4	<b>0,009</b>	0,0 (0,0–0,0)	0,999
	Anti-PD-1 + IL-2 agonista		0,999 (0,227–4,402)	0,999
Linha de tratamento da ICI	Primeira		Referência	
	Segunda	<b>0,001</b>	1,651 (0,871–3,132)	0,125
	Maior ou igual a terceira		6,087 (1,970–18,812)	<b>0,002</b>
Expressão de PD-L1	Negativa ( $\leq 1\%$ )	<b>0,005</b>	Referência	
	Positiva ( $> 1\%$ )		0,394 (0,193–0,803)	<b>0,010</b>

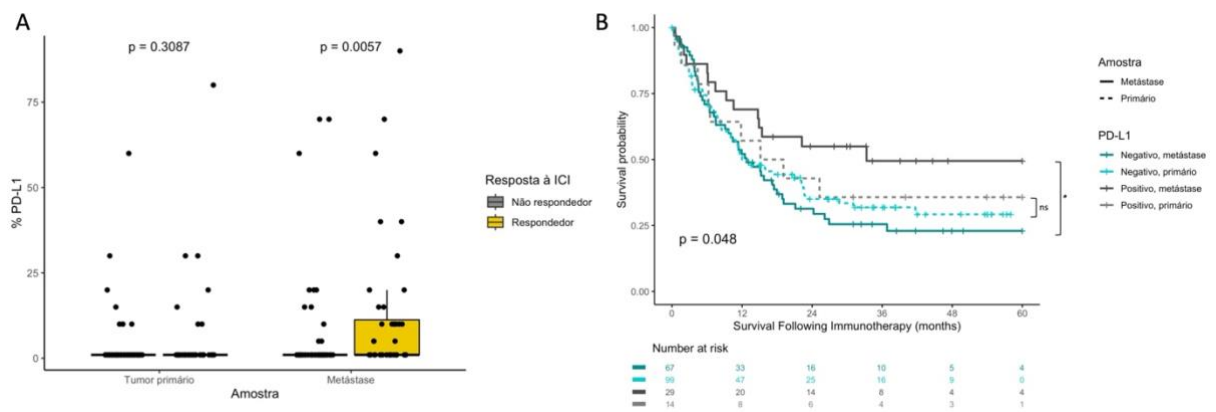
IC: intervalo de confiança

Curvas de Kaplan-Meier foram usadas para estimar a sobrevida dos pacientes após o início do tratamento imunoterápico, comparando as curvas baseando-se nas características clínicas e moleculares dos pacientes (**Tabela 3**). Uma redução significativa no tempo de sobrevida global foi observada em pacientes submetidos à linha de tratamento com ICI fora da primeira linha (mediana de 6,3 meses para terceira linha e 9,6 meses para segunda linha versus 22,1 meses para primeira linha;  $p < 0,001$ ; **Figura 11A**), ao uso de terapias anti-CTLA-4 (mediana de 7,2 meses versus 15,9 meses para anti-PD-1;  $p = 0,013$ ; **Figura 11B**), ao subtipo histológico lentiginoso acral (9,7 meses versus mais de 15 meses para os outros subtipos;  $p = 0,009$ ; **Figura 11C**), ao status selvagem da mutação *BRAF* V600 (mediana de 12,0 meses versus 27,7 meses para casos mutados;  $p = 0,009$ ; **Figura 11D**) e à expressão negativa de PD-L1 (mediana de 12,8 meses versus 25,3 meses para expressão positiva;  $p = 0,049$ ; **Figura 11E**).



**Figura 11** - Associação entre a sobrevida pós imunoterapia e variáveis clínicas e moleculares em 209 pacientes com melanoma tratados com inibidores de *checkpoint* imune (ICI). A análise incluiu: **A**) linha de tratamento sistêmico com ICI (primeira linha vs. subsequentes), **B**) tipo de ICI utilizado (anti-PD-1 vs. anti-CTLA-4), **C**) subtipo histológico do melanoma, **D**) status da mutação *BRAF* V600 (mutado vs. selvagem), e **E**) expressão tumoral de PD-L1 (positiva vs. negativa). Um paciente foi excluído da análise devido à perda de seguimento.

Como os pacientes com melanoma são tratados com ICIs no cenário metastático, realizamos as análises de associação entre resposta ao tratamento e sobrevida pós imunoterapia estratificadas pelo tipo de amostra analisada (tumor primário [ $n = 113$ ] ou metástase [ $n = 97$ ]). Observamos que a expressão de PD-L1 se mostrou significativamente associada à resposta ao tratamento ( $p = 0,006$ ; **Figura 12A**) e à sobrevida pós imunoterapia ( $p = 0,048$ ; **Figura 12B**) exclusivamente nas amostras metastáticas. Esse resultado reforça que, no contexto metastático, a expressão de PD-L1 mantém seu papel como um marcador preditivo relevante para a resposta terapêutica e a sobrevida em pacientes com melanoma tratados com ICIs.



**Figura 12** - Associação da expressão de PD-L1 com resposta ao tratamento e sobrevida em 210 pacientes com melanoma tratados com inibidores de *checkpoint* imunológico (ICI), estratificada por tipo de amostra analisada (tumor primário [ $n = 113$ ] e metástases [ $n = 97$ ]). **A**) A expressão positiva de PD-L1 mostrou-se significativamente associada à resposta ao tratamento e **B**) à sobrevida pós imunoterapia prolongada apenas nas amostras metastáticas.

### 5.3 Avaliação de imunomediadores no plasma

Para a análise do perfil de imunomediadores presente no plasma dos pacientes, foi realizado um levantamento de amostras disponíveis no Biobanco da instituição. Dentre os indivíduos que fizeram imunoterapia com anti-PD-L1 ou anti-CTLA-4, 90 possuíam amostras de sangue coletadas, processadas e armazenadas no setor, e foram incluídos para avaliação do perfil de citocinas através da técnica de CBA. Dentre os pacientes analisados, 6 foram submetidos ao tratamento com imunoterapia no contexto adjuvante, e por isso não foi possível determinar o grupo de resposta ao quais eles pertenciam, uma vez que todos estavam sem evidência de doença e este quadro se manteve durante todo o tratamento. Sendo assim,

para as análises de associação com resposta, 84 pacientes foram avaliados. Os dados clínicos destes pacientes estão apresentados na **Tabela 5**. A maioria dos pacientes (82,2%) foi tratada com terapias anti-PD-1, em monoterapia, e 57,8% deles apresentaram progressão de doença após o tratamento imunoterápico. Novamente, a distribuição dos pacientes nos grupos de resposta foi uniforme em relação às características clínicas (**Tabela 5**).

**Tabela 5** - Características clínico-patológicas e de tratamento dos 84 pacientes com melanoma avançado tratados com imunoterapia baseada em inibidores de *checkpoint* imune, cujas amostras de plasma estavam disponíveis no Biobanco.

Característica	Respondedor (n = 32)	Não-respondedor (n = 52)	p
<b>Sexo</b>			
Masculino	21 (65,6%)	28 (53,8%)	0,364
Feminino	11 (34,4%)	24 (46,2%)	
<b>Idade</b> , mediana em anos (mínimo – máximo)	54 (27 – 77)	56 (26 – 75)	0,822
<b>Cor da pele</b>			
Branca	26 (83,8%)	42 (87,5%)	0,454
Preta	1 (3,2%)	0 (0,0%)	
Parda	4 (12,9%)	6 (12,5%)	
<b>Exposição solar</b>			
Nenhuma	9 (33,3%)	16 (35,6%)	0,947
Intermitente	2 (7,4%)	4 (8,9%)	
Crônica	16 (59,3%)	25 (55,6%)	
Sem informação (n=9)			
<b>Localização da lesão</b>			
Membros inferiores	9 (28,1%)	16 (30,8%)	0,987
Tronco	6 (18,8%)	9 (17,3%)	
Cabeça e pescoço	7 (21,9%)	10 (19,2%)	
Membros superiores	5 (15,6%)	7 (13,5%)	
Primário desconhecido	4 (12,5%)	9 (17,3%)	
Outros	1 (3,1%)	1 (1,9%)	
<b>Tipo histológico</b>			
Nodular	7 (21,9%)	14 (26,9%)	0,706
Extensivo superficial	8 (25,0%)	7 (13,5%)	
Lentiginoso acral	3 (9,4%)	9 (17,3%)	
Não classificável	6 (18,8%)	11 (21,2%)	
Outros	8 (25,0%)	11 (21,2%)	
<b>Estadiamento ao diagnóstico</b>			
I	0 (0,0%)	3 (6,5%)	0,440
II	9 (34,6%)	19 (41,3%)	
III	12 (46,2%)	15 (32,6%)	
IV	5 (19,2%)	9 (19,6%)	

(continua na próxima página...)

**Tabela 5 (continuação)** - Características clínico-patológicas e de tratamento dos 84 pacientes com melanoma avançado tratados com imunoterapia baseada em inibidores de *checkpoint* imune, cujas amostras de plasma estavam disponíveis no Biobanco.

Característica	Respondedor (n = 32)	Não-respondedor (n = 52)	p
<b>Estadiamento pré-imunoterapia</b>			
III irresecável	2 (6,3%)	0 (0,0%)	0,143
IV (M1A)	1 (3,1%)	4 (7,7%)	
IV (M1B)	16 (50,0%)	17 (32,7%)	
IV (M1C)	7 (21,9%)	18 (34,6%)	
IV (M1D)	6 (18,8%)	13 (25,0%)	
<b>Número de sítios de metástase visceral</b>			
0-1	21 (65,6%)	26 (50,0%)	0,271
2-3	6 (18,8%)	18 (34,6%)	
4-5	5 (15,6%)	8 (15,4%)	
<b>Mutação BRAF V600</b>			
Mutado	16 (50,0%)	17 (36,2%)	0,075
Selvagem	14 (43,8%)	30 (63,8%)	
Inconclusivo	2 (6,3%)	0 (0,0%)	
<b>Expressão de PD-L1</b>			
Negativa ( $\leq 1\%$ )	19 (61,3%)	42 (84,0%)	<b>0,033</b>
Positiva ( $> 1\%$ )	12 (38,7%)	8 (16,0%)	
<b>Medicamento</b>			
Nivolumabe (anti-PD-1)	20 (62,5%)	33 (63,5)	0,824
Pembrolizumabe (anti-PD-1)	9 (28,1%)	12 (23,1)	
Ipilimumabe (anti-CTLA-4)	1 (3,1%)	4 (7,7%)	
Nivolumabe + NKTR-214 (agonista da via de IL-2)	2 (6,3%)	3 (5,8%)	
<b>Linha de tratamento</b>			
Primeira	19 (59,4%)	25 (48,1%)	0,311
Segunda	11 (34,4%)	18 (34,6%)	
Maior ou igual a terceira	2 (6,3%)	9 (17,3%)	
<b>Resposta ao tratamento</b>			
Progressão de doença (PD)	-	52 (100,0%)	-
Doença estável (DE)	14 (43,8%)	-	
Resposta parcial (RP)	12 (37,5%)	-	
Resposta completa (RC)	6 (18,8%)	-	

A concentração de citocinas liberadas no plasma foi determinada utilizando o CBA Analysis software e baseada na curva padrão. A concentração detectada de cada uma das 7 citocinas avaliadas está demonstrada na **Figura 13**.



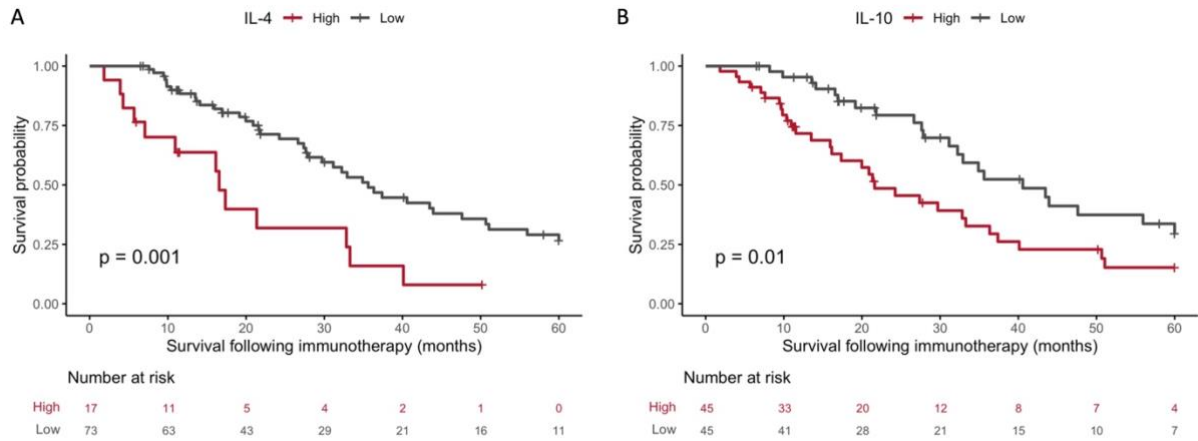
**Tabela 6** - Associação entre os níveis de citocinas e razões imunes, quantificados por Cytometric Bead Array (CBA), e a resposta terapêutica e sobrevida em 84 pacientes com melanoma tratados com inibidores de *checkpoint* imune.

Característica	Respondedor n=32 (%)	Não-respondedor n=52 (%)	<i>p</i> (resposta)	<i>Log rank p</i> (sobrevida pós ICI)
<b>IL-17A</b>				
Baixo	21 (65,6)	29 (55,8)	0,493	0,290
Alto	11 (34,4)	23 (44,2)		
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>				
Baixo	14 (43,8)	25 (48,1)	0,822	0,486
Alto	18 (56,3)	27 (51,9)		
<b>TNF</b>				
Baixo	23 (71,9)	40 (76,9)	0,614	0,677
Alto	9 (28,1)	12 (23,1)		
<b>IL-10</b>				
Baixo	18 (56,3)	23 (44,2)	0,369	<b>0,010</b>
Alto	14 (43,8)	29 (55,8)		
<b>IL-6</b>				
Baixo	21 (65,6)	16 (30,8)	<b>0,003</b>	0,589
Alto	11 (34,4)	36 (69,2)		
<b>IL-4</b>				
Baixo	26 (81,3)	41 (78,8)	1,000	<b>0,001</b>
Alto	6 (18,8)	11 (21,2)		
<b>IL-2</b>				
Baixo	28 (87,5)	44 (84,6)	1,000	0,378
Alto	4 (12,5)	8 (15,4)		
<b>Razão IL-17A/IL-10</b>				
Baixo	23 (88,5)	32 (72,7)	0,144	0,788
Alto	3 (11,5)	12 (27,3)		
<i>Missing (n = 14)</i>				
<b>Razão IL-6/IL-10</b>				
Baixo	18 (69,2)	14 (31,8)	<b>0,003</b>	0,816
Alto	8 (30,8)	30 (68,2)		
<i>Missing (n = 14)</i>				
<b>Razão IFN-<math>\gamma</math>/IL-10</b>				
Baixo	14 (53,8)	23 (52,3)	1,000	0,269
Alto	12 (46,2)	21 (47,7)		
<i>Missing (n = 214)</i>				

ICI: inibidores de *checkpoint* imunológico

Relacionado à sobrevida dos pacientes, observamos que maiores concentrações plasmáticas de IL-4 e IL-10 correlacionaram-se significativamente com uma menor sobrevida global após o início da terapia com ICI ( $p = 0,001$  e  $p = 0,010$ , respectivamente; **Tabela 6**, **Figuras 14A** e **14B**). Nenhuma das razões imunes adicionais avaliadas demonstrou diferença significativa nas curvas de sobrevida dos pacientes. Adicionalmente, combinações envolvendo IL-17A, IL-2 e IL-4 não foram exploradas, uma vez que essas citocinas não foram detectadas

no plasma da maioria dos pacientes da casuística analisada, limitando a avaliação de seu potencial impacto clínico.



**Figura 14** - Sobrevida global após imunoterapia em pacientes com melanoma avançado ( $n = 84$ ), estratificada pela concentração plasmática das citocinas **A)** IL-4 e **B)** IL-10, comparando grupos com alta e baixa concentração. A mediana (med.) de sobrevida (em meses) é indicada para cada grupo.

As variáveis concentração plasmática de IL-6, expressão de PD-L1 e mutação em *BRAF* foram incluídas em uma regressão logística multivariada para predição de resposta à imunoterapia. IL-6 e PD-L1 se mantiveram como significativas no modelo (**Tabela 7**). Pacientes com altas concentrações de IL-6 tiveram 3,5 vezes mais risco de não responderem ao tratamento com ICIs, enquanto pacientes com expressão negativa de PD-L1 ( $\leq 1\%$ ) demonstraram 4,8 vezes mais risco de falha na resposta ao tratamento.

**Tabela 7** - Análise de regressão logística binária uni- e multivariada para predição de falha de resposta à imunoterapia em pacientes com melanoma avançado tratados com inibidores de *checkpoint* imune no Hospital de Câncer de Barretos entre 2011 e 2021.

Característica	Categoria	Análise Univariada $p$	Razão de risco (95% IC)	Análise Multivariada $p$
Concentração de IL-6	Baixa		Referência	-
	Alta	<b>0,003</b>	3,53 (1,23 – 10,09)	<b>0,019</b>
Expressão de PD-L1	Positiva		Referência	-
	Negativa	<b>0,033</b>	4,84 (1,44 – 16,27)	<b>0,011</b>
Status de <i>BRAF</i>	Mutado		Referência	-
	Selvagem	0,075	1,76 (0,62 – 5,05)	0,291

IC: intervalo de confiança

#### 5.4 Painel de expressão gênica

Para a etapa de análise de expressão gênica pela técnica nCounter da Nanostring, 35 pacientes foram incluídos. Os dados clínico-patológicos desta coorte estão descritos na **Tabela 8**, estratificados por resposta às terapias anti-PD-1. A mediana de idade ao diagnóstico dos pacientes foi de 58 anos (mínimo de 24 e máximo de 78 anos). Assim como demonstrado anteriormente, a maioria dos pacientes era do sexo masculino (62,9%), com lesões em membros inferiores (34,3%), com tumores do subtipo nodular (34,3%) e sem mutação no gene *BRAF* (68,6%). Ainda, 62,9% dos pacientes foram tratados com imunoterapia como primeira linha de tratamento, e 48,6% dos pacientes tiveram progressão de doença após o tratamento imunoterápico, enquanto 25,7% dos pacientes tiveram resposta parcial ou completa. Nos respondedores, a duração mediana da resposta ao tratamento foi de 30,38 meses.

A distribuição dos pacientes entre os grupos de resposta foi homogênea em relação às características clínicas ( $p > 0,05$ ; **Tabela 8**), indicando que as diferenças na resposta ao tratamento não foram impulsionadas por esses fatores basais. No entanto, o estadiamento ao diagnóstico foi identificado como um preditor de resposta à imunoterapia ( $p = 0,024$ ), com pacientes diagnosticados nos estádios III ou IV apresentando maior probabilidade de responder ao tratamento. Esses achados indicam uma possível influência de mecanismos moleculares subjacentes na determinação da eficácia terapêutica.

**Tabela 8** - Características clínico-patológicas e de tratamento dos 35 pacientes com melanoma avançado tratados com anti-PD-1 submetidos à análise de expressão gênica utilizando o painel *NanoString nCounter Immunology V2*, estratificados por resposta à terapia.

Característica	Respondedor (n = 18)	Não-respondedor (n = 17)	p
<b>Sexo</b>			
Masculino	12 (66,7%)	10 (58,8%)	0,631
Feminino	6 (33,3%)	7 (41,2%)	
<b>Idade</b> , mediana em anos (mínimo – máximo)	58 (24 – 78)	57 (33 – 78)	0,636
<b>Exposição solar</b>			
Nenhuma	4 (22,2%)	4 (23,5%)	0,510
Intermitente	0 (0,0%)	1 (5,9%)	
Crônica	9 (50,0%)	10 (58,8%)	
Sem informação	5 (27,8%)	2 (11,8%)	
<b>Comorbidade imunometabólica</b>			
Não	14 (77,8%)	13 (76,5%)	0,926
Sim	4 (22,2%)	4 (23,5%)	

(continua na próxima página...)

**Tabela 8 (continuação)** - Características clínico-patológicas e de tratamento dos 35 pacientes com melanoma avançado tratados com anti-PD-1 submetidos à análise de expressão gênica utilizando o painel NanoString nCounter Immunology V2, estratificados por resposta à terapia.

<b>Característica</b>	<b>Respondedor (n = 18)</b>	<b>Não-respondedor (n = 17)</b>	<b>p</b>
<b>Localização da lesão</b>			
Membros inferiores	6 (33,3%)	6 (35,3%)	0,964
Tronco	2 (11,1%)	1 (5,9%)	
Cabeça e pescoço	3 (16,7%)	4 (23,5%)	
Membros superiores	4 (22,2%)	3 (17,6%)	
Outro	3 (16,7%)	3 (17,6%)	
<b>Tipo histológico</b>			
Nodular	5 (27,8%)	7 (41,2%)	0,785
Extensivo superficial	6 (33,3%)	5 (29,4%)	
Lentiginoso acral	4 (22,2%)	4 (23,5%)	
Outros	3 (16,7%)	1 (5,9%)	
<b>Estadiamento ao diagnóstico</b>			
I	0 (0,0%)	1 (5,9%)	0,120
II	3 (16,7%)	8 (47,1%)	
III	13 (72,2%)	6 (35,3%)	
IV	2 (11,1%)	2 (11,8%)	
<b>Estadiamento ao diagnóstico categorizado</b>			
Inicial (I/II)	3 (16,7%)	9 (52,9%)	<b>0,024</b>
Avançado (III/IV)	15 (83,3%)	8 (47,1%)	
<b>Estadiamento pré-imunoterapia</b>			
III irressecável	0 (0,0%)	1 (5,9%)	0,296
IV	18 (100,0%)	16 (94,1%)	
<b>Linfócitos infiltrantes de tumor (TILs)</b>			
Ausente	0 (0,0%)	2 (11,8%)	0,325
Presente inativo	11 (61,1%)	9 (52,9%)	
Presente ativo	7 (38,9%)	6 (35,3%)	
<b>Mutação <i>BRAF</i> V600</b>			
Mutado	6 (33,3%)	5 (31,2%)	0,614
Selvagem	11 (61,1%)	11 (68,8%)	
<b>Expressão de PD-L1</b>			
Negativa ( $\leq 1\%$ )	15 (83,3%)	16 (94,1%)	0,316
Positiva ( $> 1\%$ )	3 (16,7%)	1 (5,9%)	
<b>ECOG/PS</b>			
0	5 (31,2%)	6 (40,0%)	0,798
1	9 (56,2%)	8 (53,3%)	
2	2 (12,5%)	1 (6,7%)	
<b>Linha de tratamento</b>			
Primeira	10 (55,6%)	12 (70,6%)	0,475
Segunda	7 (38,9%)	5 (29,4%)	
Maior ou igual a terceira	1 (5,6%)	0 (0,0%)	

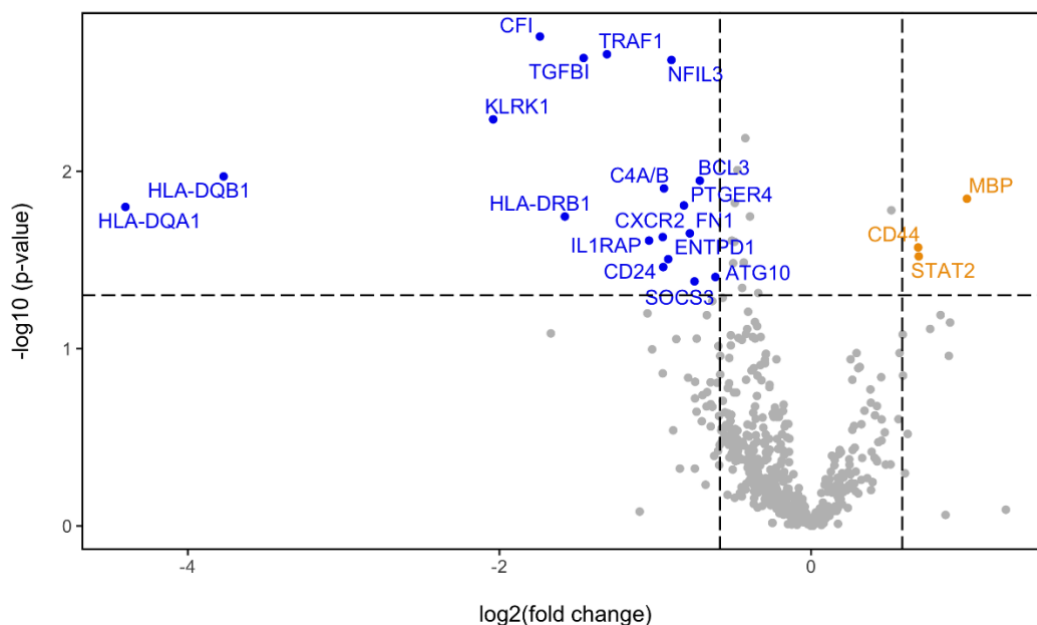
(continua na próxima página...)

**Tabela 8 (continuação)** - Características clínico-patológicas e de tratamento dos 35 pacientes com melanoma avançado tratados com anti-PD-1 submetidos à análise de expressão gênica utilizando o painel NanoString nCounter Immunology V2, estratificados por resposta à terapia.

Característica	Respondedor (n = 18)	Não-respondedor (n = 17)	p
<b>Resposta ao tratamento</b>			
Progressão de doença (PD)	-	17 (100,0%)	-
Doença estável (DE)	9 (50,0%)	-	-
Resposta parcial (RP)	7 (38,9%)	-	-
Resposta completa (RC)	2 (11,1%)	-	-
<b>Duração da resposta à imunoterapia, em meses<sup>a</sup></b>	30,4 (8,3 – 66,2)	-	-
<b>Sobrevida pós imunoterapia, em meses<sup>a</sup></b>	36,5 (12,2 – 69,5)	6.7 (1,5 – 22,8)	< 0,001

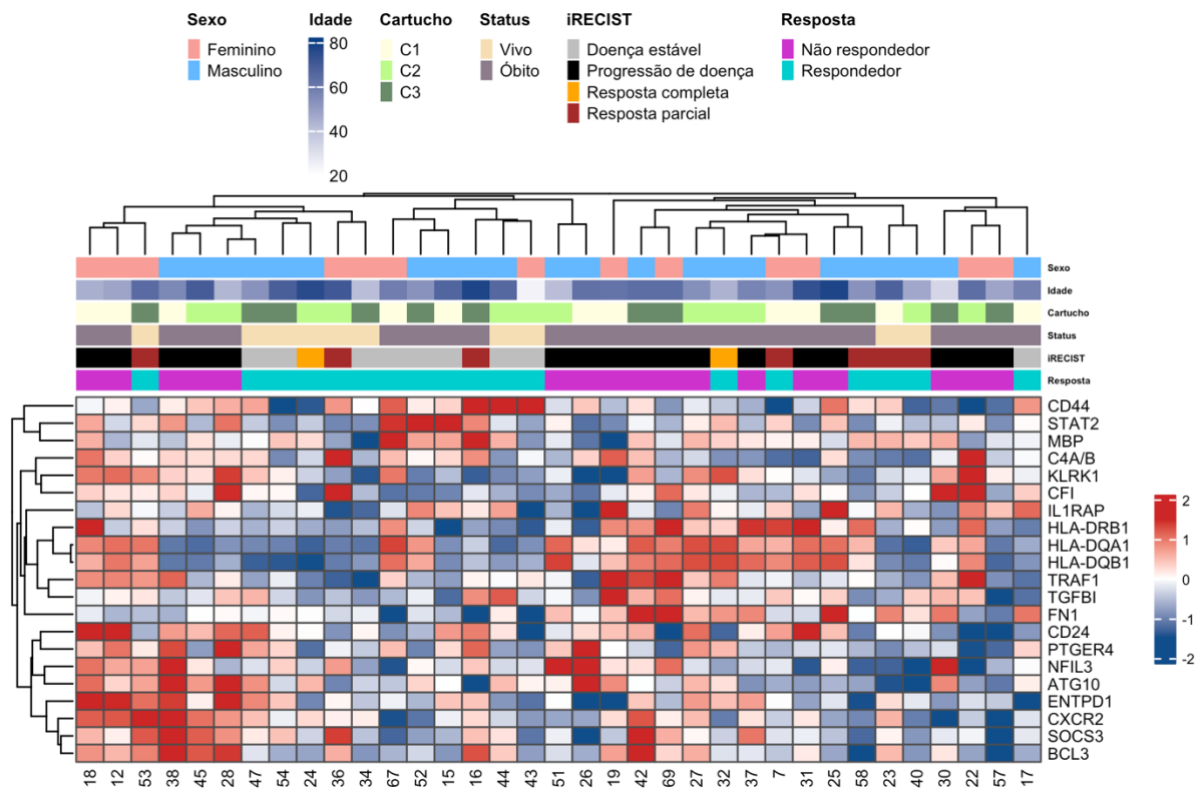
<sup>a</sup>Dados expressos em mediana (mínimo – máximo).

A análise de expressão diferencial entre pacientes respondedores e não respondedores aos inibidores de PD-1 foi realizada, considerando-se um valor de *fold change*  $\geq 1,5$  ou  $\leq -1,5$  e um  $p < 0,05$ . Foram encontrados 21 genes diferencialmente expressos entre os grupos analisados (**Figura 15**), sendo 18 genes superexpressos nos pacientes não respondedores, e 3 genes superexpressos nos pacientes respondedores.



**Figura 15** - Genes diferencialmente expressos nos pacientes respondedores ( $n = 18$ ) e não respondedores ( $n = 17$ ) às terapias anti-PD-1. À esquerda (azul) destacam-se os 18 genes com expressão aumentada nos pacientes não-respondedores, e à direita (laranja), os 3 genes com expressão aumentada em pacientes respondedores.

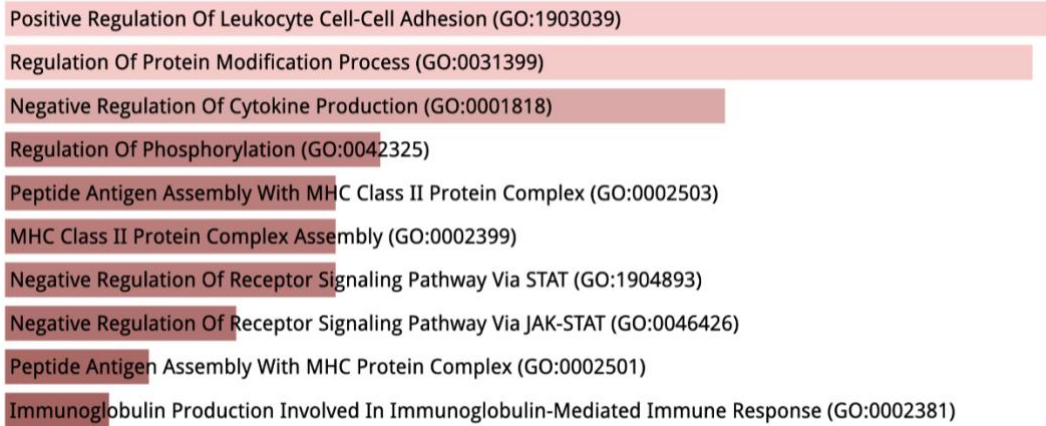
Os dados de expressão de cada um dos 21 genes foram padronizados, convertidos em z-score e estão demonstrados na **Figura 16**, juntamente com as informações de resposta ao tratamento e informações clínicas relevantes. O agrupamento hierárquico destacou a segregação dos pacientes com base na expressão desses genes, com grupos parcialmente diferenciados. Além disso, foram integradas características clínicas como idade, sexo, status vital e cartucho experimental.



**Figura 16** - Heatmap dos valores normalizados de expressão dos 21 genes diferencialmente expressos entre respondedores ( $n = 18$ ) e não respondedores ( $n = 17$ ) à terapia com inibidores de PD-1. A figura apresenta a expressão gênica normalizada (escores z) dos genes, com agrupamento hierárquico destacando a segregação entre respondedores (ciano) e não respondedores (magenta). A integração de características clínicas e de resposta ao tratamento permite visualizar associações entre padrões de expressão gênica e desfechos terapêuticos, reforçando o potencial desses genes como biomarcadores preditivos.

Uma análise de enriquecimento de processos biológicos foi conduzida com foco nos 18 genes superexpressos em pacientes não respondedores. As vias enriquecidas indicam uma regulação positiva de genes associados à apresentação de antígenos, supressão da produção de citocinas e inibição de vias de sinalização críticas, como a via JAK-STAT (**Figura 17**). Esses

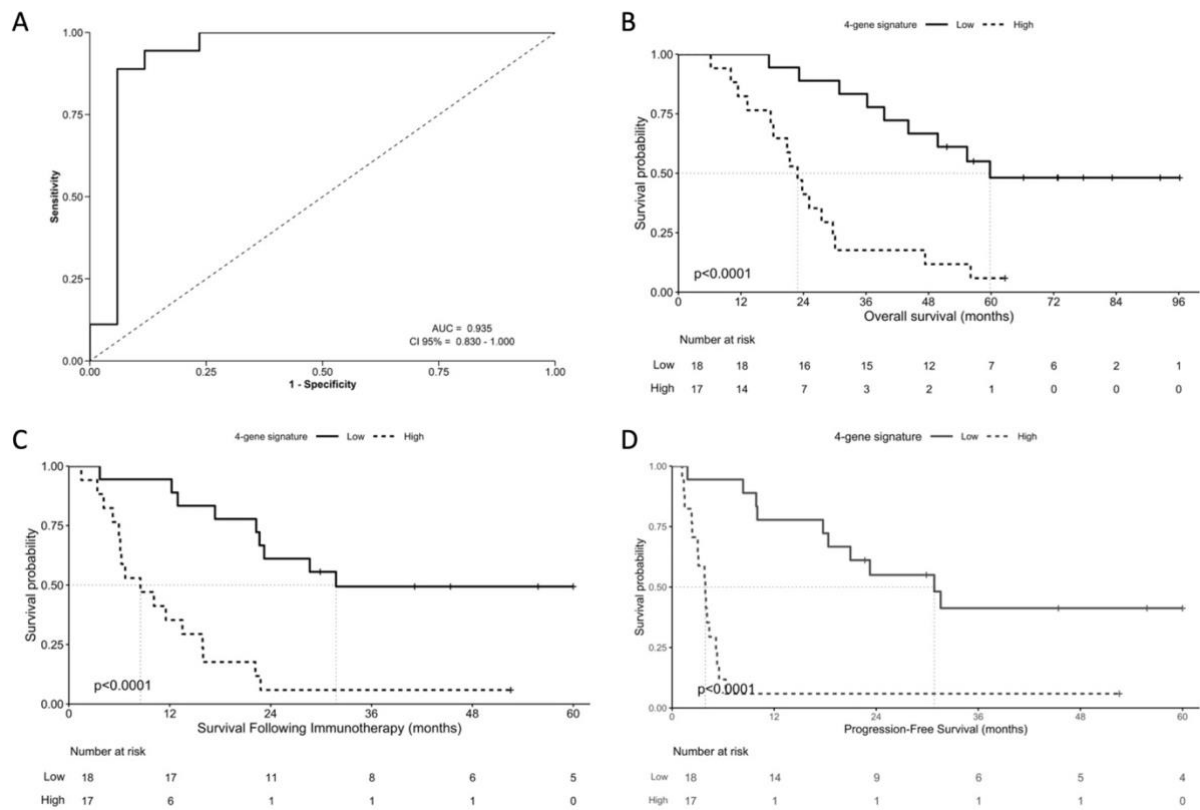
mecanismos podem estar diretamente relacionados à resistência ao tratamento observada nesses pacientes.



**Figura 17** - Análise de enriquecimento de Processos Biológicos dos 18 genes superexpressos em pacientes não respondedores ao tratamento com anti-PD-1. A análise destaca vias envolvidas na regulação imunológica e mecanismos de resistência, incluindo apresentação de antígenos, supressão de citocinas e inibição de vias de sinalização de receptores.

Os dados de expressão gênica foram analisados em modelo de regressão logística binária multiparamétrica. A partir desta análise, a combinação dos genes *CD24*, *NFIL3*, *FN1* e *KLRK1* surgiu como preditor mais significativo de falha na resposta à terapia com anti-PD-1. Esses quatro genes, que demonstraram superexpressão em pacientes não respondedores (**Figura 15**), foram integrados ao cálculo de um escore preditivo, utilizando os coeficientes da regressão logística e os níveis de expressão gênica. O escore foi, então, avaliado em modelo de curva ROC para avaliação do valor preditivo e determinação de ponto de corte para classificação desta assinatura em alta ou baixa.

O modelo preditivo resultou em uma área sob a curva (AUC) de 0,935 ( $p < 0,001$ , **Figura 18A**). Com um ponto de corte de 6,36 para categorizar os pacientes em grupos de baixo e alto escore, o modelo alcançou uma sensibilidade de 94,1% e uma especificidade de 88,9%. Além disso, foi observado que pacientes com alto escore detinham taxas reduzidas de sobrevida global ( $p < 0,001$ , **Figura 18B**), sobrevida pós imunoterapia ( $p < 0,001$ , **Figura 18C**) e sobrevida livre de progressão ( $p < 0,001$ , **Figura 18D**) quando comparados aos pacientes com baixo escore, demonstrando mais uma vez o potencial uso desta assinatura para prever o prognóstico de pacientes com melanoma avançado tratados com anti-PD-1.



**Figura 18** - Valor prognóstico da assinatura preditiva baseada em 4 genes (*CD24*, *NFIL3*, *FN1* e *KLRK1*) em pacientes com melanoma tratados com imunoterapia ( $n = 35$ ). **A**) Curva ROC demonstrando a acurácia preditiva da assinatura gênica para resposta à imunoterapia com anti-PD-1. **B**) Sobrevida global dos pacientes, estratificada por escores preditivos alto e baixo. **C**) Sobrevida após o início da imunoterapia, estratificada por escores preditivos alto e baixo. **D**) Sobrevida livre de progressão, comparando pacientes com escores alto e baixo.

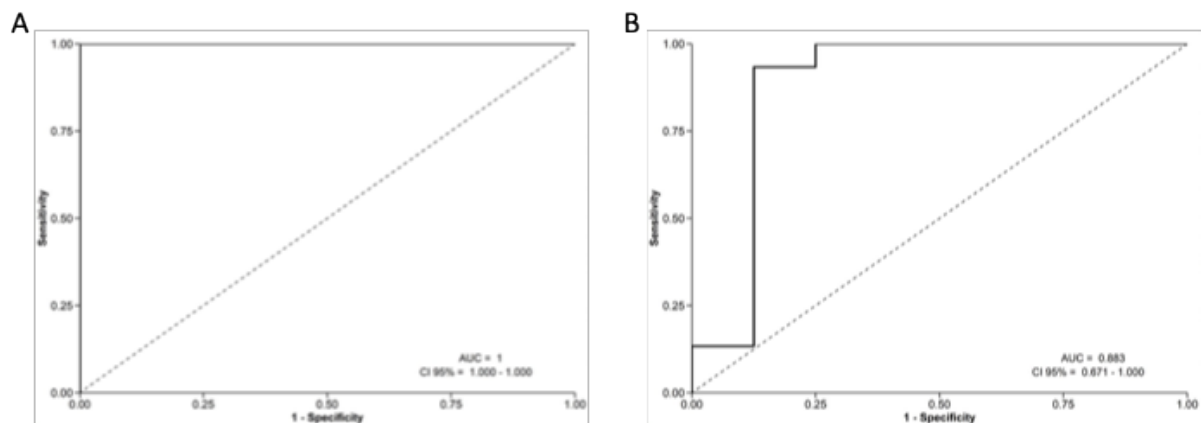
A assinatura proposta, juntamente com a variável estadiamento ao diagnóstico (inicial vs. avançado), foi incluída em modelo de regressão logística binária multivariada para cálculo da taxa de risco relativo para predição de falha de resposta ao tratamento imunoterápico (**Tabela 9**). Nesta análise, a assinatura gênica foi o único preditor independente de resposta ( $p < 0,001$ ), onde pacientes com valores altos no escore da assinatura de 4 genes tinham quase 230 vezes mais risco de não responderem ao tratamento com anti-PD-1 do que pacientes com baixos valores do escore.

**Tabela 9** - Análise de regressão logística binária uni- e multivariada para predição de falha de resposta à imunoterapia em pacientes com melanoma avançado.

Característica	Categoria	Análise Univariada <i>p</i>	Razão de risco (95% IC)	Análise Multivariada <i>p</i>
Score assinatura gênica	Baixo		Referência	-
	Alto	<b>&lt; 0,001</b>	226,85 (12,85 – 4004,18)	<b>&lt; 0,001</b>
Estadiamento ao diagnóstico	Inicial (I/II)		Referência	-
	Avançado (III/IV)	<b>0,024</b>	0,40 (0,02 – 8,65)	0,557

IC: intervalo de confiança

Em uma análise estratificada por estadiamento ao diagnóstico, o escore dos 4 genes previu com precisão a resposta em todos os casos diagnosticados nos estágios I/II, com uma AUC de 1,000 ( $p = 0,013$ ; **Figura 19A**). A assinatura gênica manteve-se significativa para casos diagnosticados em estágios III/IV (AUC = 0,887;  $p = 0,003$ ; **Figura 19B**).



**Figura 19** - Poder preditivo da assinatura de 4 genes para resposta à imunoterapia, estratificado por estadiamento ao diagnóstico dos pacientes. A) Curva ROC para predição de resposta em pacientes com estadiamentos I e II ao diagnóstico ( $n = 12$ ). B) Curva ROC para predição de resposta em pacientes com estadiamentos III e IV ao diagnóstico ( $n = 23$ ).

Os resultados desta etapa do estudo foram submetidos ao periódico *Journal of Molecular Medicine* (**Anexo D**).

### 5.5 Validação *in silico* da assinatura de expressão gênica

O valor preditivo da assinatura proposta com base na expressão dos 4 genes selecionados foi validada em duas coortes independentes<sup>74, 94</sup>, com dados de RNA-seq

disponíveis. As características dos pacientes de cada coorte estão demonstrados na **Tabela 10**.

**Tabela 10** - Caracterização dos pacientes das coortes independentes de validação, derivadas de estudos previamente publicados. A coorte 1 é composta por 23 pacientes selecionados, enquanto a coorte 2 inclui 26 pacientes.

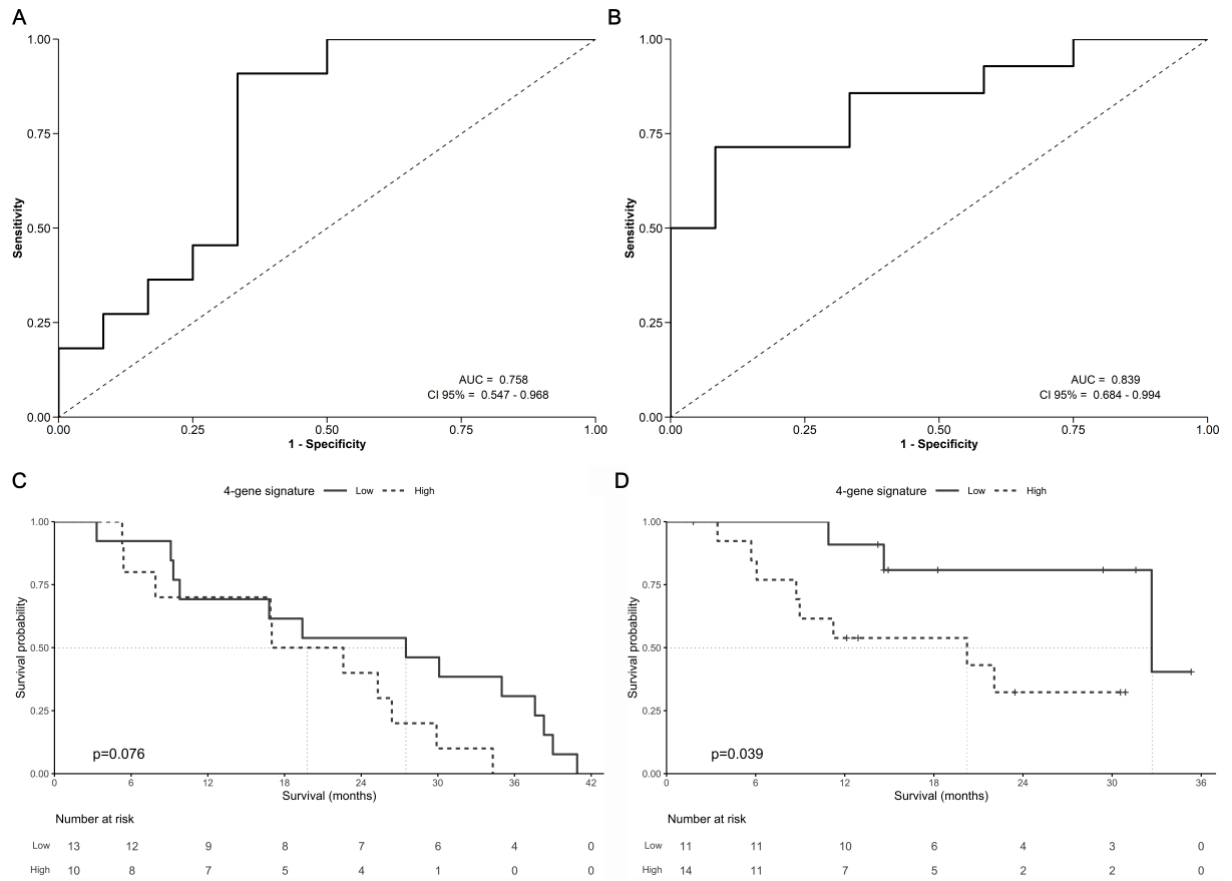
	Coorte 1 (GSE91061)			Coorte 2 (GSE78220)		
	Respondedor (n = 11)	Não-respondedor (n = 12)	p	Respondedor (n = 14)	Não-respondedor (n = 12)	p
<b>Status BRAF</b>						
Selvagem	6 (54,5%)	8 (66,7%)	0,552 <sup>b</sup>	8 (57,1%)	6 (50,0%)	0,552 <sup>b</sup>
Mutado	5 (45,5%)	4 (33,3%)		6 (42,9%)	6 (50,0%)	
<b>Resposta à imunoterapia</b>						
Doença estável	5 (45,5%)	-	-	-	-	-
Resposta parcial	4 (36,4%)	-		10 (71,4%)	-	
Resposta completa	2 (18,2%)	-		4 (28,6%)	-	
Progressão de doença	-	12 (100,0%)		-	12 (100,0%)	
<b>Sobrevida (meses)<sup>a</sup></b>	30,10 (9,10 – 40,90)	13,35 (3,30 – 34,30)	0,008 <sup>c</sup>	18,27 (12,13 – 35,33)	9,93 (1,80 – 23,47)	0,002 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Dados expressos em mediana (mínimo - máximo)

<sup>b</sup> Teste de qui-quadrado

<sup>c</sup> Teste de Mann-Whitney

Na primeira coorte, a assinatura apresentou uma AUC de 0,758 ( $p = 0,036$ ; **Figura 20A**) para predição de resposta ao tratamento com anti-PD-1. Utilizando um ponto de corte de 0,745, a assinatura demonstrou uma sensibilidade de 66,7% e uma especificidade de 81,8%. Na segunda coorte, uma AUC de 0,839 ( $p = 0,003$ ; **Figura 20B**) foi demonstrada. Com um ponto de corte de 1,72, a sensibilidade aumentou para 91,7% e a especificidade foi de 71,4%. Embora pacientes com escores baixos na coorte 1 tenham apresentado uma tendência à maior sobrevida global, o resultado não foi estatisticamente significativo ( $p = 0,076$ ; **Figura 20C**). Já a coorte 2 confirmou a significância da assinatura na predição de sobrevida, com escores mais baixos associados a uma sobrevida global prolongada ( $p = 0,039$ ; **Figura 20D**).



**Figura 20** - Validação do escore preditivo de 4 genes para resposta às terapias anti-PD-1 em duas coortes independentes. A figura apresenta as curvas ROC da **A**) coorte 1 (GSE91061), composta por 23 pacientes, e da **B**) coorte 2 (GSE78220), com 26 pacientes, demonstrando a acurácia do escore na predição de resposta ao tratamento. Além disso, são exibidas as associações dos escores com a sobrevida global na **C**) coorte 1 e na **D**) coorte 2, estratificadas pelo valor ótimo de corte definido utilizando a ferramenta Cutoff Finder.

## 6 DISCUSSÃO

Assim como em todo o mundo, a imunoterapia com ICIs vem ganhando espaço no Brasil<sup>80</sup>. Embora esta modalidade tenha trazido melhoras para o tratamento do melanoma, apenas uma parcela dos pacientes se beneficia de seu uso<sup>35</sup>. Portanto, é necessário explorar mecanismos que possam prever a resposta ao tratamento, permitindo um melhor manejo dos pacientes. Este estudo teve como objetivo investigar o perfil de expressão tumoral de PD-L1, o perfil de expressão gênica e a concentração de citocinas plasmáticas como biomarcadores preditivos de resposta à terapia com ICI em pacientes brasileiros com melanoma avançado em um cenário de mundo real. Aqui, demonstramos que o uso de PD-L1, de uma assinatura gênica ou da concentração de IL-6, juntamente com informações clínicas, como a linha e o agente do tratamento imunoterápico, e moleculares, como mutações em *BRAF*, poderiam ser implementados no cenário clínico para identificar pacientes que poderiam se beneficiar dos tratamentos com terapias de bloqueio de *checkpoints* imunes.

O microambiente tumoral influencia a eficácia dos tratamentos imunoterápicos e permite a identificação de possíveis estratégias para melhorar as respostas terapêuticas, visando a interação entre células tumorais e células imunes. Como exemplo, a matriz extracelular densa e a formação anormal de vasos sanguíneos podem limitar a infiltração e a distribuição de agentes imunoterápicos dentro do tumor, reduzindo sua eficácia<sup>97</sup>. As células tumorais podem produzir fatores que suprimem as respostas imunológicas, como as proteínas PD-L1 que se ligam aos receptores correspondentes PD-1 nos linfócitos T, levando à exaustão destes e a respostas antitumorais prejudicadas<sup>98, 99</sup>. Além disso, o microambiente tumoral pode recrutar células imunes reguladoras, como linfócitos T reguladores e células supressoras derivadas de mieloides, que suprimem ainda mais a atividade antitumoral<sup>100, 101</sup>.

Os biomarcadores fornecem sinais biológicos que ajudam a identificar os melhores candidatos para tratamentos sistêmicos do câncer com maior precisão<sup>102</sup>. Existe uma necessidade crescente de biomarcadores para serem usados no dia a dia de um centro oncológico, sendo que o custo deve ser viável para a expansão para toda a população. No Brasil, por exemplo, o Sistema Único de Saúde não consegue cobrir todos os custos para a aplicação generalizada desse tratamento, e os efeitos adversos relacionados à terapia também acarretam custos substanciais para o serviço público, reforçando a demanda por biomarcadores para orientar as indicações terapêuticas e reduzir as desigualdades na

saúde<sup>103-105</sup>. Para a imunoterapia, essa abordagem personalizada é especialmente importante, pois pode aumentar as taxas de sucesso do tratamento, reduzindo o risco de efeitos colaterais<sup>106</sup>. Diversos estudos identificaram biomarcadores promissores para vários tipos de câncer, como a expressão de PD-L1<sup>107</sup>, a carga mutacional do tumor<sup>108</sup>, status de instabilidade de microssatélites<sup>109</sup>, a interação entre ICI e o microambiente tumoral<sup>110</sup>, e assinaturas gênicas<sup>111</sup>. No entanto, o cenário do melanoma ainda carece de marcadores aprovados e validados<sup>112-114</sup>.

Em estudos clínicos, a expressão tumoral de PD-L1 é considerada um preditor insuficiente da resposta objetiva aos ICIs, onde os pacientes se beneficiam do tratamento independentemente dos níveis de expressão de PD-L1 detectados<sup>26, 33, 35</sup>, corroborando com o nosso estudo, onde demonstramos que a expressão de PD-L1 esteve significativamente associada à resposta ao tratamento e à sobrevida pós-imunoterapia nas amostras de tecido tumoral metastático. Isso pode ser explicado por sua expressão dinâmica e heterogênea<sup>115, 116</sup>, que varia de acordo com a progressão da doença<sup>117</sup> e diferentes protocolos de tratamento, incluindo a imunoterapia<sup>94</sup>. Além disso, várias razões poderiam explicar a heterogeneidade nos níveis de expressão de PD-L1 como biomarcador previsível de resposta: diferenças nas amostras de tecido, valor de corte para considerar positiva sua expressão, uso de TPS ou CPS, bem como a técnica de detecção utilizada. Neste estudo, 34,3% dos pacientes com expressão negativa de PD-L1 apresentaram respostas objetivas após o tratamento com ICI, sugerindo que seu uso deve ser combinado com outras variáveis clínicas relevantes na prática da especialidade. Uma comparação entre a positividade de PD-L1, que variou de 21,0% a 81,7%, e as taxas de resposta objetiva em pacientes sem expressão desse biomarcador, que variaram de 20,7% a 37,9%, é apresentada na **Tabela 11**, em conjunto com os resultados obtidos neste estudo, permitindo contextualizar nossos achados em relação à literatura existente.

**Tabela 11** - Comparação da positividade de PD-L1 e taxas de resposta em casos com expressão negativa de PD-L1 em pacientes com melanoma tratados com imunoterapia em diferentes populações.

Estudo	Clone (IHC)	População (Estudo clínico)	n	PD-L1 pos (%)	Resposta objetiva em casos PD-L1 neg (%)
Sorroche et al. <sup>96</sup>	E1L3N	Brasil	210	21,0	34,3
Taube et al. <sup>118</sup>	5H1	EUA	110	39,0	Não avaliado
Carlino et al. <sup>119</sup>	22C3	Multicêntrico (KEYNOTE-006)	821	81,7	20,7

(continua na próxima página...)

**Tabela 11 (continuação)** - Comparação da positividade de PD-L1 e taxas de resposta em casos com expressão negativa de PD-L1 em pacientes com melanoma tratados com imunoterapia em diferentes populações.

Estudo	Clone (IHC)	População (Estudo clínico)	n	PD-L1 pos (%)	Resposta objetiva em casos PD-L1 neg (%)
Morrison et al. <sup>120</sup>	28-8	EUA e Espanha	298	33,0	37,9
In et al. <sup>121</sup>	SP142	EUA	745	35,6	Não avaliado
Placke et al. <sup>122</sup>	28-8	Alemanha (CA209-578)	448	40,0	22,3
Caraban et al. <sup>123</sup>	CAL10	Romênia	61	45,9	Não avaliado

IHC: imuno-histoquímica; Pos.: positivo; Neg.: negativo.

Células Th1 secretam citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, que promovem a ativação de linfócitos T citotóxicos e macrófagos, levando à morte celular tumoral, enquanto células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que estimulam a produção de anticorpos por células B e a ativação de eosinófilos, sendo importantes para a defesa contra patógenos extracelulares<sup>124-126</sup>. Ainda, células Th17 secretam IL-17, IL-21 e IL-22, que promovem a resposta inflamatória e a produção de antimicrobianos, sendo crucial na defesa contra patógenos intracelulares<sup>124</sup>. Na imunoterapia com ICI, as citocinas desempenham papéis distintos na modulação da atividade dos linfócitos T e na determinação do sucesso do tratamento<sup>125</sup>. Neste estudo, encontramos que altas concentrações de IL-4, IL-6 e IL-10 no plasma de pacientes com melanoma avançado estavam associadas a falhas na resposta e diminuição das taxas de sobrevida após a imunoterapia. A IL-10 é uma citocina pleiotrópica com funções importantes na regulação da resposta imune, principalmente na supressão da inflamação e na promoção da tolerância<sup>127</sup>. Já a IL-6 é uma citocina inflamatória que desempenha um papel importante na regulação do sistema imunológico e na resposta inflamatória<sup>128</sup>.

No contexto do melanoma, a IL-6 tem sido objeto de estudo, especialmente no âmbito da imunoterapia<sup>129-131</sup>. Esta citocina pode criar um ambiente imunossupressor, promovendo a ativação de células imunes supressoras e interferindo na atividade dos linfócitos T efetores<sup>132</sup>. Além disso, a IL-6 também pode influenciar o microambiente tumoral, estimulando a proliferação celular, angiogênese e resistência à apoptose, contribuindo para a progressão do melanoma<sup>131, 133, 134</sup>. Estudos indicam que níveis elevados de IL-6 podem estar associados a uma menor resposta à imunoterapia nestes pacientes<sup>129, 130, 135, 136</sup>, em concordância com as nossas análises, que evidenciaram a associação entre os altos níveis de

liberação de IL-6 no plasma e a falha na resposta ao tratamento com ICI. De maneira interessante, estudos clínicos recentes, como o NCT05428007, estão investigando a combinação de anti-IL-6R (sarilumabe) com ICIs, como ipilimumabe, nivolumabe e relatlimabe, visando superar a resistência à imunoterapia e melhorar os desfechos em pacientes com melanoma.

A razão aumentada entre IL-6/IL-10 também mostrou estar associada à não resposta ao tratamento com ICI. Um estudo conduzido por Ryan e colaboradores<sup>137</sup> revelou que a IL-10 pode viabilizar o processo de respiração celular em linfócitos T exaustos, restabelecendo sua capacidade de atuar contra o tumor. Entretanto, altas concentrações de IL-10 e IL-4 no plasma demonstraram associação com uma menor sobrevida pós imunoterapia desses pacientes. Resultado semelhante foi demonstrado por Mahipal e colaboradores<sup>138</sup> para a IL-10, evidenciando uma diminuição na sobrevida no grupo de pacientes com concentração elevada desta citocina em comparação ao grupo com baixa concentração. Além disso, tanto IL-10 quando IL-4 possuem funções imunossupressoras, que promovem o crescimento e a metástase de tumores, auxiliando no desenvolvimento de um ambiente imunossupressor<sup>139, 140</sup>, o que poderia explicar o pior prognóstico encontrado na nossa casuística.

No campo da investigação da imunoterapia, o estudo de biomarcadores isolados é frequentemente prejudicado pela heterogeneidade do tumor, taxas de resposta variáveis e efeitos colaterais significativos associados a terapias de alto custo, pois podem não captar toda a complexidade dos processos biológicos envolvidos<sup>141, 142</sup>. Para enfrentar esses desafios, as assinaturas genéticas surgiram como uma abordagem proeminente. O uso de diferentes parâmetros em uma assinatura permite uma avaliação abrangente das características do tumor, minimizando os efeitos da heterogeneidade tumoral que muitas vezes dificultam o estudo de biomarcadores isolados na pesquisa de imunoterapia<sup>143-147</sup>. No entanto, a maioria das assinaturas de expressão desenvolvidas atualmente é derivada de dados de sequenciamento de RNA completo (RNA-seq) ou de sequenciamento de RNA de células únicas (scRNA-seq), técnicas de alto custo que não estão amplamente disponíveis, especialmente em países em desenvolvimento. Neste estudo, apresentamos uma assinatura gênica altamente preditiva desenvolvida utilizando a tecnologia NanoString nCounter. Esse método é reconhecido por sua alta sensibilidade e custo reduzido em comparação com o RNA-sequenciamento, tornando-o uma alternativa mais acessível e econômica para a geração de assinaturas prognósticas confiáveis<sup>148</sup>.

Em nossa análise envolvendo 35 pacientes tratados com anti-PD-1, encontramos 21 genes diferencialmente expressos entre respondedores e não respondedores. A partir de uma regressão logística multivariada, propusemos uma assinatura de 4 genes (*CD24*, *NFIL3*, *KLRK1* e *FN1*) altamente preditiva, onde todos os genes demonstraram regulação positiva em pacientes não respondedores tratados com terapias anti-PD-1. A assinatura proposta se mostrou um preditor independente da resposta ao tratamento com ICI, bem como da sobrevida livre de progressão e sobrevida global dos pacientes. O valor preditivo da assinatura foi consistentemente significativo nas coortes de validação, apesar das variações na quantificação da expressão gênica devido a diferenças nos métodos de análise.

O gene *CD24* codifica uma proteína altamente glicosilada que é normalmente expressa em granulócitos, monócitos e linfócios T e B. Essa proteína atua como uma molécula coestimuladora que aumenta a proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup><sup>149</sup>. No entanto, o *CD24* também está associado a mecanismos imunossupressores, como a superexpressão e a estimulação funcional de células T reguladoras<sup>150</sup> e a evasão da fagocitose por macrófagos associados a tumores<sup>151</sup>. A expressão elevada de *CD24* em células tumorais está associada a piores desfechos. No melanoma, esse gene foi relacionado a células com características de células-tronco tumorais<sup>152</sup>, sobrevida global reduzida<sup>153</sup>, e metástase<sup>154</sup>, sugerindo um fenótipo mais agressivo que pode contribuir para a menor resposta aos ICI observada neste estudo.

O gene *NFIL3* codifica um fator de transcrição que controla a diferenciação de células imunes, promove a regeneração nervosa e influencia o metabolismo energético por meio de seu papel na regulação do ritmo circadiano<sup>155</sup>. Em células tumorais, o *NFIL3* pode inibir a morte celular e está associado a um pior prognóstico<sup>156</sup>. Zhou et al. demonstraram uma correlação negativa entre a expressão de *NFIL3* e a infiltração de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no melanoma, além de seu valor preditivo para resistência à terapia com anti-PD-1<sup>157</sup>. Ainda, o *NFIL3* está associado à indução de TIM-3 em linfócitos T, o que contribui para um microambiente imunossupressor<sup>158</sup>.

O gene *KLRK1* codifica a proteína NKG2D, um importante receptor estimulatório em células *natural killer* (NK). Normalmente, o estresse celular induz a expressão dos ligantes de NKG2D, ativando as células NK para destruir células danificadas por meio de mecanismos mediados por perforina. A NKG2D também fornece estímulo adicional para células T CD8<sup>+</sup><sup>159</sup>,<sup>160</sup>. Por outro lado, a NKG2D pode estar associada à inflamação promotora de tumores em

certos tipos de câncer, destacando a complexidade das interações imunológicas<sup>161, 162</sup>. Níveis mais elevados de ligantes solúveis de NKG2D e maior infiltração de células NK foram relacionados à resistência ao tratamento com anti-PD-1 no melanoma<sup>163, 164</sup>. A expressão basal aumentada de *KLRK1* em pacientes não respondedores em nosso estudo pode indicar mecanismos imunológicos adaptativos e interações complexas entre células imunes, contribuindo para a variabilidade observada na resposta ao tratamento.

Por fim, a glicoproteína FN1, abundantemente encontrada na matriz extracelular, desempenha diversas funções no desenvolvimento, crescimento celular, diferenciação, adesão e processos de migração<sup>165</sup>. No melanoma, a FN1 está associada à proliferação tumoral, migração e metástase<sup>166</sup>. Além disso, ela está relacionada à infiltração de células imunes. Análises scRNA-seq em amostras de melanoma identificaram um subconjunto de macrófagos com alta expressão de *FN1* que prediz a falta de resposta aos ICI<sup>167</sup>, corroborando os achados apresentados neste estudo.

A assinatura preditiva desenvolvida neste estudo apresentou desempenho consistente e robusto em múltiplas coortes, com valores de AUC variando de 0,758 a 0,935, demonstrando alta capacidade discriminatória e um potencial promissor para aplicação clínica como biomarcador na predição da resposta à terapia com anti-PD-1. Um achado relevante foi a precisão da assinatura em prever a resposta mesmo em pacientes diagnosticados em estágios iniciais (AUC = 1,000 no estágio I/II), evidenciando sua utilidade para orientar decisões terapêuticas antes da progressão para doença avançada. A validação em duas coortes independentes reforçou a confiabilidade e a generalizabilidade da assinatura. Enquanto a coorte 1 apresentou uma AUC moderada, o desempenho foi significativamente superior na coorte 2, sugerindo que fatores específicos, como características demográficas dos pacientes ou protocolos de tratamento, podem impactar a acurácia preditiva. Essas variações na sensibilidade e especificidade entre as coortes destacam a importância de estudos prospectivos adicionais em populações diversas, visando aprimorar o modelo preditivo e assegurar sua aplicabilidade em diferentes contextos clínicos.

Uma análise de enriquecimento dos genes superexpressos em não respondedores identificou vias-chave associadas à evasão imunológica e à resistência à terapia ICI. Os processos biológicos enriquecidos incluíram apresentação de antígenos, supressão da produção de citocinas e inibição de vias de sinalização críticas, como a via JAK-STAT,

reforçando ainda mais o papel de um ambiente imunossupressor e promotor de tumores em não respondedores<sup>168-173</sup>.

Nas células neoplásicas, caracterizadas por crescimento e divisão anormais, as vias metabólicas desempenham um papel fundamental. Essas células geralmente apresentam alterações em seu metabolismo energético, conhecido como efeito Warburg, em que dependem preferencialmente da glicólise para a produção de energia, mesmo na presença de oxigênio<sup>174</sup>. Essa mudança metabólica permite que as células neoplásicas sustentem seu rápido crescimento e proliferação. A reconfiguração do metabolismo das células tumorais apresenta dois desafios às células do sistema imunológico: 1) a produção de produtos residuais que suprimem a função imunológica e 2) o esgotamento dos nutrientes de que as células imunes precisam para funcionar adequadamente<sup>175</sup>. Um fator importante na batalha entre o câncer e o sistema imunológico é a adaptação do metabolismo das células imunes no ambiente tumoral. Os TILs, uma população heterogênea de células imunes, podem se infiltrar nos tecidos tumorais e desencadear uma resposta imunológica contra as células tumorais. Essas células são atraídas para o microambiente tumoral por uma complexa interação de sinais químicos, incluindo citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, os quais são produzidos tanto pelas células tumorais quanto pelas células estromais circundantes<sup>176</sup>. Essas alterações podem ter um impacto significativo na resposta imune<sup>177</sup>, dificultando a infiltração, a ativação e as funções efetoras dos linfócitos<sup>178, 179</sup>. Notavelmente, uma taxa aumentada de TILs em pacientes com melanoma é considerada um indicador prognóstico positivo<sup>180</sup>.

Neste estudo, validamos alguns biomarcadores relatados anteriormente em outras populações, como a expressão PD-L1 em células tumorais e células imunes<sup>181</sup>, as mutações *BRAF* V600<sup>182</sup>, e a concentração de IL-6<sup>136</sup>, e desenvolvemos uma assinatura baseada em 4 genes para predição de resposta à ICIs em uma população de pacientes com melanoma avançado brasileiros. O entendimento dos mecanismos envolvidos a estes biomarcadores é fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes<sup>183</sup>. As características clínicas descritas neste estudo estão alinhadas com achados prévios do grupo em relação às frequências observadas. Embora o subtipo histológico nodular não seja o mais comum em pacientes com melanoma<sup>184</sup>, ele foi o subtipo mais frequente em todas as etapas da nossa análise. Liu et al. demonstraram que a taxa mediana de crescimento de melanomas nodulares é de 0,49 mm por mês, em contraste com 0,12 mm em melanomas extensivos superficiais<sup>185</sup>. Além disso, estudos anteriores, como o de Cherobin et al.<sup>186</sup>, indicaram que o

subtipo nodular é um fator de risco independente para o desenvolvimento de metástases, reforçando a importância de considerar essa variável na avaliação prognóstica e no manejo terapêutico dos pacientes. Em relação ao tratamento, nossos resultados também estão de acordo com outros estudos em que os pacientes que receberam monoterapia com anti-PD1 ou uma combinação de anti-PD1 e anti-CTLA-4 responderam melhor do que os pacientes tratados apenas com anti-CTLA-4<sup>182, 187</sup>. Além disso, um estudo clínico recente demonstrou que o uso do ICI como primeira linha é benéfico para pacientes com melanoma avançado<sup>188</sup>, e a geração de novas combinações de *checkpoints* imunes que beneficiariam uma população mais ampla de pacientes<sup>28</sup>.

Até o momento, este estudo representa a primeira análise abrangente de múltiplos biomarcadores e dados clínico-patológicos na população brasileira com melanoma avançado, investigando sua relação com a resposta ao tratamento com ICI, em um cenário de mundo real. A estratificação de pacientes é particularmente importante para evitar que pacientes que não se beneficiarão de determinados tratamentos sejam submetidos a eles, evitando assim a toxicidade, dando tempo para que outros tratamentos sejam considerados e economizando no custo dos tratamentos. Apesar da crescente adoção global da imunoterapia adjuvante e neoadjuvante<sup>189</sup>, essas abordagens terapêuticas ainda não foram aprovadas em países subdesenvolvidos. Isso levou a um aumento nas disputas de saúde relacionadas ao tratamento do melanoma avançado, destacando a necessidade de otimizar a alocação da terapia e reduzir as disparidades de saúde<sup>190</sup>.

Uma limitação importante deste estudo é a predominância de amostras provenientes de tumores primários, em detrimento de metástases, devido à natureza retrospectiva da pesquisa e às dificuldades associadas à obtenção de amostras de órgãos viscerais, onde a maioria das metástases de melanoma ocorre. Além disso, o intervalo entre a coleta do material biológico e o início da imunoterapia variou significativamente, desde alguns dias até vários anos, o que pode influenciar a representatividade do microambiente tumoral no momento do tratamento. O uso de uma coorte retrospectiva e a análise de material biológico em massa também podem ter contribuído para aumentar a heterogeneidade dos dados. Em algumas análises, o tamanho reduzido da amostra representou uma limitação adicional, especialmente em subgrupos específicos. Apesar dessas limitações, os dados obtidos fornecem novas percepções que podem ser exploradas no desenvolvimento de um painel personalizado de biomarcadores para prever a resposta ao tratamento com ICI em pacientes

com melanoma. Estudos prospectivos, com coleta de amostras padronizada e acompanhamento clínico rigoroso, são necessários para validar nossas descobertas e aprimorar a compreensão desse cenário clínico.

## 7 CONCLUSÃO

Em conclusão, neste estudo observamos que a expressão positiva de PD-L1 em amostras tumorais metastáticas foi associada a uma melhor resposta ao tratamento e a uma sobrevida prolongada. Por outro lado, níveis aumentados de IL-6 foram associados a uma menor resposta à terapia, enquanto concentrações elevadas de IL-4 e IL-10 mostraram associação com sobrevida global diminuída. Finalmente, desenvolvemos uma assinatura de 4 genes (*CD24*, *NFIL3*, *FN1* e *KLRK1*) que demonstrou alta precisão na predição de resistência primária ao tratamento com anti-PD-1. Essa assinatura foi validada em coortes independentes, confirmando sua confiabilidade e utilidade na identificação de pacientes com menor probabilidade de se beneficiar da terapia.

A integração desses biomarcadores com informações clínicas e moleculares, como a linha de tratamento e o status de mutação em *BRAF*, permitiu uma abordagem mais personalizada para prever a resposta à terapia. A assinatura de 4 genes e os níveis de citocinas mostraram-se particularmente úteis na identificação de pacientes resistentes ao tratamento. Os resultados deste estudo oferecem contribuições importantes para a compreensão e estratificação do melanoma avançado em pacientes brasileiros, dentro de um contexto de mundo real. A validação de biomarcadores previamente descritos na literatura, juntamente com o desenvolvimento de uma assinatura gênica robusta relacionada à resposta imune, reforça a confiabilidade e a utilidade desses preditores na orientação de decisões terapêuticas.

## 8 REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. *World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals*. Geneva: **World Health Organization**; 2018.
2. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, et al. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. [Internet] Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2024 [cited 18 Feb]; Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>.
3. Urban K, Mehrmal S, Uppal P, Giese RL, Delost GR. *The global burden of skin cancer: A longitudinal analysis from the Global Burden of Disease Study, 1990-2017*. **JAAD Int**. 2021;2:98-108.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer Statistics, 2017*. **CA Cancer J Clin**. 2017;67(1):7-30.
5. American Cancer Society. *About Basal and Squamous Cell Skin Cancer*. Atlanta: **American Cancer Society**; 2016.
6. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. **CA Cancer J Clin**. 2021;71(3):209-49.
7. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil Rio de Janeiro: INCA*; 2022.
8. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, et al. *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors*. **Eur J Cancer**. 2005;41(14):2040-59.
9. Mort RL, Jackson IJ, Patton EE. *The melanocyte lineage in development and disease*. **Development**. 2015;142(4):620-32.
10. Bastian BC. *The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia*. **Annu Rev Pathol**. 2014;9:239-71.
11. Elder DE, Board WCTE, Massi D, Scolyer RA, Willemze R. *WHO Classification of Skin Tumours: WHO Classification of Tumours, Volume 11: World Health Organization*; 2018.
12. Ossio R, Roldan-Marin R, Martinez-Said H, Adams DJ, Robles-Espinoza CD. *Melanoma: a global perspective*. **Nat Rev Cancer**. 2017;17(7):393-4.
13. Rabbie R, Ferguson P, Molina-Aguilar C, Adams DJ, Robles-Espinoza CD. *Melanoma subtypes: genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities*. **J Pathol**. 2019;247(5):539-51.

14. Dummer R, Guggenheim M, Arnold AW, Braun R, von Moos R, Project Group Melanoma of the Swiss Group for Clinical Cancer R. *Updated Swiss guidelines for the treatment and follow-up of cutaneous melanoma*. **Swiss Med Wkly**. 2011;141:w13320.
15. Kittler H, Pehamberger H, Wolff K, Binder M. *Diagnostic accuracy of dermoscopy*. **Lancet Oncol**. 2002;3(3):159-65.
16. 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.
17. Keung EZ, Gershenwald JE. *The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care*. **Expert Rev Anticancer Ther**. 2018;18(8):775-84.
18. *SEER cancer statistics factsheets: melanoma of the skin*. [Internet]: National Cancer Institute; 2016 [cited Feb 1]; Available from: [seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html](http://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html).
19. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. *Cutaneous melanoma*. **Lancet**. 2005;365(9460):687-701.
20. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2018*. **Atlanta: American Cancer Society**; 2018.
21. Long GV, Hauschild A, Santinami M, Atkinson V, Mandala M, Chiarion-Sileni V, et al. *Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma*. **N Engl J Med**. 2017;377(19):1813-23.
22. Eggermont AMM, Blank CU, Mandala M, Long GV, Atkinson V, Dalle S, et al. *Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma*. **N Engl J Med**. 2018;378(19):1789-801.
23. Bertolotto C. *Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options*. **Scientifica (Cairo)**. 2013;2013:635203.
24. Sullivan RJ, Lorusso PM, Flaherty KT. *The intersection of immune-directed and molecularly targeted therapy in advanced melanoma: where we have been, are, and will be*. **Clin Cancer Res**. 2013;19(19):5283-91.
25. Faje AT, Sullivan R, Lawrence D, Tritos NA, Fadden R, Klibanski A, et al. *Ipilimumab-induced hypophysitis: a detailed longitudinal analysis in a large cohort of patients with metastatic melanoma*. **J Clin Endocrinol Metab**. 2014;99(11):4078-85.

26. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. *Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation*. **N Engl J Med**. 2015;372(4):320-30.
27. Gutzmer R, Stroyakovskiy D, Gogas H, Robert C, Lewis K, Protsenko S, et al. *Atezolizumab, vemurafenib, and cobimetinib as first-line treatment for unresectable advanced BRAF(V600) mutation-positive melanoma (IMspire150): primary analysis of the randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial*. **Lancet**. 2020;395(10240):1835-44.
28. Tawbi HA, Schadendorf D, Lipson EJ, Ascierto PA, Matamala L, Castillo Gutierrez E, et al. *Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma*. **N Engl J Med**. 2022;386(1):24-34.
29. Ribas A. *Tumor immunotherapy directed at PD-1*. **N Engl J Med**. 2012;366(26):2517-9.
30. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. **N Engl J Med**. 2010;363(8):711-23.
31. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, et al. *Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma*. **N Engl J Med**. 2011;364(26):2517-26.
32. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, Hodi FS, Gutzmer R, Neyns B, et al. *Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial*. **Lancet Oncol**. 2015;16(4):375-84.
33. Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. *Pembrolizumab versus ipilimumab in Advanced Melanoma*. **N Engl J Med**. 2015;372(26):2521-32.
34. Ribas A, Puzanov I, Dummer R, Schadendorf D, Hamid O, Robert C, et al. *Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial*. **Lancet Oncol**. 2015;16(8):908-18.
35. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Rutkowski P, Grob JJ, Cowey CL, et al. *Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma*. **N Engl J Med**. 2017;377(14):1345-56.
36. Ling DC, Bakkenist CJ, Ferris RL, Clump DA. *Role of Immunotherapy in Head and Neck Cancer*. **Semin Radiat Oncol**. 2018;28(1):12-6.
37. NIH. *National Cancer Institute*. 2018.

38. Mihm MC, Jr., Clemente CG, Cascinelli N. *Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response.* **Lab Invest.** 1996;74(1):43-7.
39. Liestol K, Larsen TE, Grude TH. *A Retrospective histological study of 669 cases of primary cutaneous malignant melanoma in clinical stage I. 8. The Relative prognostic value of various clinical and histological features evaluated by Cox's regression model.* **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A.** 1982;90(6):449-54.
40. Azimi F, Scolyer RA, Rumcheva P, Moncrieff M, Murali R, McCarthy SW, et al. *Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma.* **J Clin Oncol.** 2012;30(21):2678-83.
41. Wherry EJ. *T cell exhaustion.* **Nat Immunol.** 2011;12(6):492-9.
42. Schietinger A, Greenberg PD. *Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction.* **Trends Immunol.** 2014;35(2):51-60.
43. Crespo J, Sun H, Welling TH, Tian Z, Zou W. *T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment.* **Curr Opin Immunol.** 2013;25(2):214-21.
44. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. *Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation.* **Immunity.** 2016;44(5):989-1004.
45. Wherry EJ, Kurachi M. *Molecular and cellular insights into T cell exhaustion.* **Nat Rev Immunol.** 2015;15(8):486-99.
46. Belk JA, Daniel B, Satpathy AT. *Epigenetic regulation of T cell exhaustion.* **Nat Immunol.** 2022;23(6):848-60.
47. Bengsch B, Johnson AL, Kurachi M, Odorizzi PM, Pauken KE, Attanasio J, et al. *Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8(+) T Cell Exhaustion.* **Immunity.** 2016;45(2):358-73.
48. Richter FC, Saliutina M, Hegazy AN, Bergthaler A. *Take my breath away-mitochondrial dysfunction drives CD8(+) T cell exhaustion.* **Genes Immun.** 2024;25(1):4-6.
49. Fourcade J, Sun Z, Benallaoua M, Guillaume P, Luescher IF, Sander C, et al. *Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients.* **J Exp Med.** 2010;207(10):2175-86.
50. Koyama S, Akbay EA, Li YY, Herter-Sprue GS, Buczkowski KA, Richards WG, et al. *Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints.* **Nat Commun.** 2016;7:10501.

51. Thommen DS, Schreiner J, Muller P, Herzig P, Roller A, Belousov A, et al. *Progression of Lung Cancer Is Associated with Increased Dysfunction of T Cells Defined by Coexpression of Multiple Inhibitory Receptors.* **Cancer Immunol Res.** 2015;3(12):1344-55.
52. Woo SR, Turnis ME, Goldberg MV, Bankoti J, Selby M, Nirschl CJ, et al. *Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape.* **Cancer Res.** 2012;72(4):917-27.
53. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. *Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity.* **J Exp Med.** 2010;207(10):2187-94.
54. Rothfelder K, Hagelstein I, Roerden M, Blumenstock G, Hofmann M, Nuebling T, et al. *Expression of the Immune Checkpoint Modulator OX40 in Acute Lymphoblastic Leukemia Is Associated with BCR-ABL Positivity.* **Neoplasia.** 2018;20(11):1150-60.
55. Gough MJ, Ruby CE, Redmond WL, Dhungel B, Brown A, Weinberg AD. *OX40 agonist therapy enhances CD8 infiltration and decreases immune suppression in the tumor.* **Cancer Res.** 2008;68(13):5206-15.
56. Gough MJ, Crittenden MR, Sarff M, Pang P, Seung SK, Vetto JT, et al. *Adjuvant therapy with agonistic antibodies to CD134 (OX40) increases local control after surgical or radiation therapy of cancer in mice.* **J Immunother.** 2010;33(8):798-809.
57. Linch SN, McNamara MJ, Redmond WL. *OX40 Agonists and Combination Immunotherapy: Putting the Pedal to the Metal.* **Front Oncol.** 2015;5:34.
58. Akhmetzyanova I, Zelinsky G, Littwitz-Salomon E, Malyshkina A, Dietze KK, Streeck H, et al. *CD137 Agonist Therapy Can Reprogram Regulatory T Cells into Cytotoxic CD4+ T Cells with Antitumor Activity.* **J Immunol.** 2016;196(1):484-92.
59. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation.* **Cell.** 2011;144(5):646-74.
60. Otsuka A, Dreier J, Cheng PF, Nageli M, Lehmann H, Felderer L, et al. *Hedgehog pathway inhibitors promote adaptive immune responses in basal cell carcinoma.* **Clin Cancer Res.** 2015;21(6):1289-97.
61. Sarvaria A, Madrigal JA, Saudemont A. *B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity.* **Cell Mol Immunol.** 2017;14(8):662-74.

62. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, et al. *Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies*. **Semin Cancer Biol**. 2015;35 Suppl:S185-S98.
63. Pardoll DM. *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. **Nat Rev Cancer**. 2012;12(4):252-64.
64. Algazi AP, Tsai KK, Shoushtari AN, Munhoz RR, Eroglu Z, Piulats JM, et al. *Clinical outcomes in metastatic uveal melanoma treated with PD-1 and PD-L1 antibodies*. **Cancer**. 2016;122(21):3344-53.
65. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. *Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer*. **N Engl J Med**. 2015;372(21):2018-28.
66. Motzer RJ, Rini BI, McDermott DF, Redman BG, Kuzel TM, Harrison MR, et al. *Nivolumab for Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase II Trial*. **J Clin Oncol**. 2015;33(13):1430-7.
67. Bauml J, Seiwert TY, Pfister DG, Worden F, Liu SV, Gilbert J, et al. *Pembrolizumab for Platinum- and Cetuximab-Refractory Head and Neck Cancer: Results From a Single-Arm, Phase II Study*. **J Clin Oncol**. 2017;35(14):1542-9.
68. Ayers M, Luceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR, et al. *IFN-gamma-related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade*. **J Clin Invest**. 2017;127(8):2930-40.
69. Kato R, Yamasaki M, Urakawa S, Nishida K, Makino T, Morimoto-Okazawa A, et al. *Increased Tim-3(+) T cells in PBMCs during nivolumab therapy correlate with responses and prognosis of advanced esophageal squamous cell carcinoma patients*. **Cancer Immunol Immunother**. 2018;67(11):1673-83.
70. Xu-Monette ZY, Zhang M, Li J, Young KH. *PD-1/PD-L1 Blockade: Have We Found the Key to Unleash the Antitumor Immune Response?* **Front Immunol**. 2017;8:1597.
71. Patel SP, Kurzrock R. *PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy*. **Mol Cancer Ther**. 2015;14(4):847-56.
72. Goodman A, Patel SP, Kurzrock R. *PD-1-PD-L1 immune-checkpoint blockade in B-cell lymphomas*. **Nat Rev Clin Oncol**. 2017;14(4):203-20.
73. Grigg C, Rizvi NA. *PD-L1 biomarker testing for non-small cell lung cancer: truth or fiction?* **J Immunother Cancer**. 2016;4:48.

74. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, et al. *Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma*. **Cell**. 2017;168(3):542.
75. Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L, et al. *Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma*. **Science**. 2015;350(6257):207-11.
76. Goodman AM, Kato S, Bazhenova L, Patel SP, Frampton GM, Miller V, et al. *Tumor Mutational Burden as an Independent Predictor of Response to Immunotherapy in Diverse Cancers*. **Mol Cancer Ther**. 2017;16(11):2598-608.
77. McQuade JL, Daniel CR, Hess KR, Mak C, Wang DY, Rai RR, et al. *Association of body-mass index and outcomes in patients with metastatic melanoma treated with targeted therapy, immunotherapy, or chemotherapy: a retrospective, multicohort analysis*. **Lancet Oncol**. 2018;19(3):310-22.
78. Cortellini A, Bersanelli M, Buti S, Cannita K, Santini D, Perrone F, et al. *A multicenter study of body mass index in cancer patients treated with anti-PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors: when overweight becomes favorable*. **J Immunother Cancer**. 2019;7(1):57.
79. Richtig G, Hoeller C, Wolf M, Wolf I, Rainer BM, Schuler G, et al. *Body mass index may predict the response to ipilimumab in metastatic melanoma: An observational multi-centre study*. **PLoS One**. 2018;13(10):e0204729.
80. da Costa LMM, Crovador CS, de Carvalho CEB, Vazquez VL. *Characteristics of Brazilian melanomas: real-world results before and after the introduction of new therapies*. **BMC Res Notes**. 2019;12(1):296.
81. Saloum de Neves Manta F, Pereira R, Vianna R, Rodolfo Beuttenmuller de Araujo A, Leite Goes Gitai D, Aparecida da Silva D, et al. *Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels*. **PLoS One**. 2013;8(9):e75145.
82. Pena SD, Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Bydlowski SP. *DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians*. **Braz J Med Biol Res**. 2009;42(10):870-6.
83. Tas F, Erturk K. *Acral Lentiginous Melanoma Is Associated with Certain Poor Prognostic Histopathological Factors but May Not be Correlated with Nodal Involvement, Recurrence, and a Worse Survival*. **Pathobiology**. 2018;85(4):227-31.
84. Bradford PT, Goldstein AM, McMaster ML, Tucker MA. *Acral lentiginous melanoma: incidence and survival patterns in the United States, 1986-2005*. **Arch Dermatol**. 2009;145(4):427-34.

85. Vazquez Vde L, Silva TB, Vieira Mde A, de Oliveira AT, Lisboa MV, de Andrade DA, et al. *Melanoma characteristics in Brazil: demographics, treatment, and survival analysis*. **BMC Res Notes**. 2015;8:4.
86. Nakamura Y, Fujisawa Y. *Diagnosis and Management of Acral Lentiginous Melanoma*. **Curr Treat Options Oncol**. 2018;19(8):42.
87. Seymour L, Bogaerts J, Perrone A, Ford R, Schwartz LH, Mandrekar S, et al. *iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics*. **Lancet Oncol**. 2017;18(3):e143-e52.
88. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, et al. *Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs*. **Nat Biotechnol**. 2008;26(3):317-25.
89. Cesano A. *nCounter((R)) PanCancer Immune Profiling Panel (NanoString Technologies, Inc., Seattle, WA)*. **J Immunother Cancer**. 2015;3:42.
90. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. **Genome Biol**. 2002;3(7):RESEARCH0034.
91. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. *clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters*. **OMICS**. 2012;16(5):284-7.
92. Kanehisa M, Goto S. *KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes*. **Nucleic Acids Res**. 2000;28(1):27-30.
93. Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, Gyorffy B, Schmitt WD, Darb-Esfahani S, et al. *Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization*. **PLoS One**. 2012;7(12):e51862.
94. Riaz N, Havel JJ, Makarov V, Desrichard A, Urba WJ, Sims JS, et al. *Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab*. **Cell**. 2017;171(4):934-49 e16.
95. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, et al. *Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma*. **Cell**. 2016;165(1):35-44.
96. Sorroche BP, Teixeira RJ, Pereira CAD, Santana IVV, Vujanovic L, Vazquez VL, et al. *PD-L1 Tumor Expression as a Predictive Biomarker of Immune Checkpoint Inhibitors' Response and Survival in Advanced Melanoma Patients in Brazil*. **Diagnostics (Basel)**. 2023;13(6).

97. Lim AR, Rathmell WK, Rathmell JC. *The tumor microenvironment as a metabolic barrier to effector T cells and immunotherapy*. **Elife**. 2020;9.
98. Zhang H, Dai Z, Wu W, Wang Z, Zhang N, Zhang L, et al. *Regulatory mechanisms of immune checkpoints PD-L1 and CTLA-4 in cancer*. **J Exp Clin Cancer Res**. 2021;40(1):184.
99. Said SS, Ibrahim WN. *Cancer Resistance to Immunotherapy: Comprehensive Insights with Future Perspectives*. **Pharmaceutics**. 2023;15(4).
100. Tanaka A, Sakaguchi S. *Regulatory T cells in cancer immunotherapy*. **Cell Res**. 2017;27(1):109-18.
101. Li K, Shi H, Zhang B, Ou X, Ma Q, Chen Y, et al. *Myeloid-derived suppressor cells as immunosuppressive regulators and therapeutic targets in cancer*. **Signal Transduct Target Ther**. 2021;6(1):362.
102. Nwafor JN, Torere BE, Agu E, Kadiku L, Ogunyemi T, Akinsanya PA, et al. *The Role of Biomarkers in the Diagnosis and Prognosis of Different Stages of Melanoma*. **Cureus**. 2023;15(5):e38693.
103. Aguiar P, Jr., Perry LA, Lopes GL, Jr. *Cost-effectiveness of immune checkpoint inhibitors in NSCLC according to PD-L1 expression*. **Lung Cancer Manag**. 2016;5(3):119-22.
104. Duarte HS, da Veiga CRP, da Veiga CP, Wainstein AJA, da Silva WV, Drummond-Lage AP. *Does it fit in your pocket? economic burden of PD-1 inhibitors' toxicity in the supplementary health system: evidence from Brazil*. **BMC Health Serv Res**. 2023;23(1):781.
105. Kelner M, Carvalho da Silva B, Montella T, Aguiar PN, Jr., Lopes G, Ferreira CG, et al. *Discrepancies Between the Cost of Advanced Lung Cancer Treatment and How Much Is Reimbursed by the Brazilian Public Healthcare System*. **Value Health Reg Issues**. 2023;33:1-6.
106. Kovacs SA, Fekete JT, Gyorffy B. *Predictive biomarkers of immunotherapy response with pharmacological applications in solid tumors*. **Acta Pharmacol Sin**. 2023;44(9):1879-89.
107. Ellebaek E, Khan S, Bastholt L, Schmidt H, Haslund CA, Donia M, et al. *PD-L1 is a biomarker of real-world clinical outcomes for anti-CTLA-4 plus anti-PD-1 or anti-PD-1 monotherapy in metastatic melanoma*. **Eur J Cancer**. 2024;198:113476.
108. Sha D, Jin Z, Budczies J, Kluck K, Stenzinger A, Sinicrope FA. *Tumor Mutational Burden as a Predictive Biomarker in Solid Tumors*. **Cancer Discov**. 2020;10(12):1808-25.
109. Dudley JC, Lin MT, Le DT, Eshleman JR. *Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade*. **Clin Cancer Res**. 2016;22(4):813-20.

110. Li X, Yue Z, Wang D, Zhou L. *PTPRC functions as a prognosis biomarker in the tumor microenvironment of cutaneous melanoma*. **Sci Rep**. 2023;13(1):20617.
111. Liu W, Peng Y, Tobin DJ. *A new 12-gene diagnostic biomarker signature of melanoma revealed by integrated microarray analysis*. **PeerJ**. 2013;1:e49.
112. Mooradian MJ, Sullivan RJ. *Immunotherapy in Melanoma: Recent Advancements and Future Directions*. **Cancers (Basel)**. 2023;15(16).
113. Gide TN, Quek C, Menzies AM, Tasker AT, Shang P, Holst J, et al. *Distinct Immune Cell Populations Define Response to Anti-PD-1 Monotherapy and Anti-PD-1/Anti-CTLA-4 Combined Therapy*. **Cancer Cell**. 2019;35(2):238-55 e6.
114. Liu D, Schilling B, Liu D, Sucker A, Livingstone E, Jerby-Arnon L, et al. *Integrative molecular and clinical modeling of clinical outcomes to PD1 blockade in patients with metastatic melanoma*. **Nat Med**. 2019;25(12):1916-27.
115. Grossman JE, Vasudevan D, Joyce CE, Hildago M. *Is PD-L1 a consistent biomarker for anti-PD-1 therapy? The model of balstilimab in a virally-driven tumor*. **Oncogene**. 2021;40(8):1393-5.
116. Zhao X, Bao Y, Meng B, Xu Z, Li S, Wang X, et al. *From rough to precise: PD-L1 evaluation for predicting the efficacy of PD-1/PD-L1 blockades*. **Front Immunol**. 2022;13:920021.
117. Boothman AM, Scott M, Ratcliffe M, Whiteley J, Dennis PA, Wadsworth C, et al. *Impact of Patient Characteristics, Prior Therapy, and Sample Type on Tumor Cell Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Patients with Advanced NSCLC Screened for the ATLANTIC Study*. **J Thorac Oncol**. 2019;14(8):1390-9.
118. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. *Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape*. **Sci Transl Med**. 2012;4(127):127ra37.
119. Carlino MS, Long GV, Schadendorf D, Robert C, Ribas A, Richtig E, et al. *Outcomes by line of therapy and programmed death ligand 1 expression in patients with advanced melanoma treated with pembrolizumab or ipilimumab in KEYNOTE-006: A randomised clinical trial*. **Eur J Cancer**. 2018;101:236-43.
120. Morrison C, Pabla S, Conroy JM, Nesline MK, Glenn ST, Dressman D, et al. *Predicting response to checkpoint inhibitors in melanoma beyond PD-L1 and mutational burden*. **J Immunother Cancer**. 2018;6(1):32.

121. In GK, Poorman K, Saul M, O'Day S, Farma JM, Olszanski AJ, et al. *Molecular profiling of melanoma brain metastases compared to primary cutaneous melanoma and to extracranial metastases*. **Oncotarget**. 2020;11(33):3118-28.
122. Placke JM, Kimmig M, Griewank K, Herbst R, Terheyden P, Utikal J, et al. *Correlation of tumor PD-L1 expression in different tissue types and outcome of PD-1-based immunotherapy in metastatic melanoma - analysis of the DeCOG prospective multicenter cohort study ADOREG/TRIM*. **EBioMedicine**. 2023;96:104774.
123. Caraban BM, Matei E, Cozaru GC, Aschie M, Deacu M, Enciu M, et al. *PD-L1, CD4+, and CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) Expression Profiles in Melanoma Tumor Microenvironment Cells*. **J Pers Med**. 2023;13(2).
124. Lee S, Margolin K. *Cytokines in cancer immunotherapy*. **Cancers (Basel)**. 2011;3(4):3856-93.
125. Berraondo P, Sanmamed MF, Ochoa MC, Etxeberria I, Aznar MA, Perez-Gracia JL, et al. *Cytokines in clinical cancer immunotherapy*. **Br J Cancer**. 2019;120(1):6-15.
126. Waldmann TA. *Cytokines in Cancer Immunotherapy*. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 2018;10(12).
127. Saraiva M, O'Garra A. *The regulation of IL-10 production by immune cells*. **Nat Rev Immunol**. 2010;10(3):170-81.
128. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. *IL-6 in inflammation, immunity, and disease*. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 2014;6(10):a016295.
129. Huseni MA, Wang L, Klementowicz JE, Yuen K, Breart B, Orr C, et al. *CD8(+) T cell-intrinsic IL-6 signaling promotes resistance to anti-PD-L1 immunotherapy*. **Cell Rep Med**. 2023;4(1):100878.
130. Vilgelm AE. *Illuminating the mechanism of IL-6-mediated immunotherapy resistance*. **Cell Rep Med**. 2023;4(1):100901.
131. Soler MF, Abaurrea A, Azcoaga P, Araujo AM, Caffarel MM. *New perspectives in cancer immunotherapy: targeting IL-6 cytokine family*. **J Immunother Cancer**. 2023;11(11).
132. Beyranvand Nejad E, Labrie C, van der Sluis TC, van Duikeren S, Franken K, Roosenhoff R, et al. *Interleukin-6-mediated resistance to immunotherapy is linked to impaired myeloid cell function*. **Int J Cancer**. 2021;148(1):211-25.

133. Raskova M, Lacina L, Kejik Z, Venhauerova A, Skalickova M, Kolar M, et al. *The Role of IL-6 in Cancer Cell Invasiveness and Metastasis-Overview and Therapeutic Opportunities*. **Cells**. 2022;11(22).
134. Liu Q, Yu S, Li A, Xu H, Han X, Wu K. *Targeting interleukin-6 to relieve immunosuppression in tumor microenvironment*. **Tumour Biol**. 2017;39(6):1010428317712445.
135. Laino AS, Woods D, Vassallo M, Qian X, Tang H, Wind-Rotolo M, et al. *Serum interleukin-6 and C-reactive protein are associated with survival in melanoma patients receiving immune checkpoint inhibition*. **J Immunother Cancer**. 2020;8(1).
136. Wang Y, Ramachandran V, Sui D, Xu K, Haydu LE, Fang S, et al. *Evaluation of Plasma IL-6 in Patients with Melanoma as a Prognostic and Checkpoint Immunotherapy Predictive Biomarker*. **J Invest Dermatol**. 2022;142(7):2046-9 e3.
137. Ryan D, Frezza C. *IL-10-Mediated Refueling of Exhausted T Cell Mitochondria Boosts Anti-Tumour Immunity*. **Immunometabolism**. 2021;3(4):e210030.
138. Mahipal A, Terai M, Berd D, Chervoneva I, Patel K, Mastrangelo MJ, et al. *Tumor-derived interleukin-10 as a prognostic factor in stage III patients undergoing adjuvant treatment with an autologous melanoma cell vaccine*. **Cancer Immunol Immunother**. 2011;60(7):1039-45.
139. Setrerrahmane S, Xu H. *Tumor-related interleukins: old validated targets for new anti-cancer drug development*. **Mol Cancer**. 2017;16(1):153.
140. Mirlekar B. *Tumor promoting roles of IL-10, TGF-beta, IL-4, and IL-35: Its implications in cancer immunotherapy*. **SAGE Open Med**. 2022;10:20503121211069012.
141. McDermott JE, Wang J, Mitchell H, Webb-Robertson BJ, Hafen R, Ramey J, et al. *Challenges in Biomarker Discovery: Combining Expert Insights with Statistical Analysis of Complex Omics Data*. **Expert Opin Med Diagn**. 2013;7(1):37-51.
142. Yang C, Luo G, Cheng H, Lu Y, Jin K, Wang Z, et al. *Potential biomarkers to evaluate therapeutic response in advanced pancreatic cancer*. **2018**. 2018;7(1):208-18.
143. Cristescu R, Aurora-Garg D, Albright A, Xu L, Liu XQ, Loboda A, et al. *Tumor mutational burden predicts the efficacy of pembrolizumab monotherapy: a pan-tumor retrospective analysis of participants with advanced solid tumors*. **J Immunother Cancer**. 2022;10(1).
144. Giampietri C, Scatozza F, Crecca E, Vigiano Benedetti V, Natali PG, Facchiano A. *Analysis of gene expression levels and their impact on survival in 31 cancer-types patients identifies novel prognostic markers and suggests unexplored immunotherapy treatment options in a wide range of malignancies*. **J Transl Med**. 2022;20(1):467.

145. Ensenyat-Mendez M, Orozco JIJ, Llinas-Arias P, Iniguez-Munoz S, Baker JL, Salomon MP, et al. *Construction and validation of a gene expression classifier to predict immunotherapy response in primary triple-negative breast cancer*. **Commun Med (Lond)**. 2023;3(1):93.
146. Pauken KE, Shahid O, Lagattuta KA, Mahuron KM, Lubber JM, Lowe MM, et al. *Single-cell analyses identify circulating anti-tumor CD8 T cells and markers for their enrichment*. **J Exp Med**. 2021;218(4).
147. Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E, Mauck WM, 3rd, Zheng S, Butler A, et al. *Integrated analysis of multimodal single-cell data*. **Cell**. 2021;184(13):3573-87 e29.
148. Picornell AC, Echavarria I, Alvarez E, Lopez-Tarruella S, Jerez Y, Hoadley K, et al. *Breast cancer PAM50 signature: correlation and concordance between RNA-Seq and digital multiplexed gene expression technologies in a triple negative breast cancer series*. **BMC Genomics**. 2019;20(1):452.
149. Panagiotou E, Syrigos NK, Charpidou A, Kotteas E, Vathiotis IA. *CD24: A Novel Target for Cancer Immunotherapy*. **J Pers Med**. 2022;12(8).
150. Bakr MN, Takahashi H, Kikuchi Y. *Analysis of Melanoma Gene Expression Signatures at the Single-Cell Level Uncovers 45-Gene Signature Related to Prognosis*. **Biomedicines**. 2022;10(7).
151. Barkal AA, Brewer RE, Markovic M, Kowarsky M, Barkal SA, Zaro BW, et al. *CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy*. **Nature**. 2019;572(7769):392-6.
152. Tang MR, Guo JY, Wang D, Xu N. *Identification of CD24 as a marker for tumorigenesis of melanoma*. **Onco Targets Ther**. 2018;11:3401-6.
153. Tang MR, Wang YX, Guo S, Han SY, Li HH, Jin SF. *CD24 expression predicts poor prognosis for patients with cutaneous malignant melanoma*. **Int J Clin Exp Med**. 2014;7(11):4337-41.
154. Gschaidner M, Neumann F, Peters B, Lenz F, Cibena M, Goiser M, et al. *An attempt at a molecular prediction of metastasis in patients with primary cutaneous melanoma*. **PLoS One**. 2012;7(11):e49865.
155. Kashiwada M, Levy DM, McKeag L, Murray K, Schroder AJ, Canfield SM, et al. *IL-4-induced transcription factor NFIL3/E4BP4 controls IgE class switching*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2010;107(2):821-6.
156. Keniry M, Pires MM, Mense S, Lefebvre C, Gan B, Justiano K, et al. *Survival factor NFIL3 restricts FOXO-induced gene expression in cancer*. **Genes Dev**. 2013;27(8):916-27.

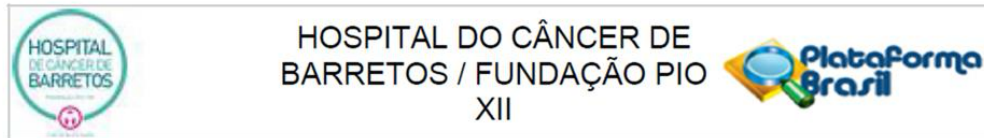
157. Zhou J, Li X, Zhang M, Gong J, Li Q, Shan B, et al. *The aberrant expression of rhythm genes affects the genome instability and regulates the cancer immunity in pan-cancer.* **Cancer Med.** 2020;9(5):1818-29.
158. Zhu C, Sakuishi K, Xiao S, Sun Z, Zaghouani S, Gu G, et al. *An IL-27/NFIL3 signalling axis drives Tim-3 and IL-10 expression and T-cell dysfunction.* **Nat Commun.** 2015;6:6072.
159. Kohlhapp FJ, O'Sullivan JA, Moore TV, Zloza A, Guevara-Patino JA. *NKG2D signaling shifts the balance of CD8 T cells from single cytokine- to polycytokine-producing effector cells.* **Mol Immunol.** 2023;155:1-6.
160. Siemaszko J, Marzec-Przyszlak A, Bogunia-Kubik K. *NKG2D Natural Killer Cell Receptor-A Short Description and Potential Clinical Applications.* **Cells.** 2021;10(6).
161. Sheppard S, Ferry A, Guedes J, Guerra N. *The Paradoxical Role of NKG2D in Cancer Immunity.* **Front Immunol.** 2018;9:1808.
162. Sheppard S, Guedes J, Mroz A, Zavitsanou AM, Kudo H, Rothery SM, et al. *The immunoreceptor NKG2D promotes tumour growth in a model of hepatocellular carcinoma.* **Nat Commun.** 2017;8:13930.
163. Maccalli C, Giannarelli D, Chiarucci C, Cutaia O, Giacobini G, Hendrickx W, et al. *Soluble NKG2D ligands are biomarkers associated with the clinical outcome to immune checkpoint blockade therapy of metastatic melanoma patients.* **Oncoimmunology.** 2017;6(7):e1323618.
164. Landeloos E, Pozniak J, Roda N, Visscher AD, Martinez AA, Herck YV, et al. *NK cells contribute to resistance to anti-PD1 therapy in immune-excluded melanomas.* 2023:2023.12.14.571631.
165. Yamada KM, Olden K. *Fibronectins--adhesive glycoproteins of cell surface and blood.* **Nature.** 1978;275(5677):179-84.
166. Li B, Shen W, Peng H, Li Y, Chen F, Zheng L, et al. *Fibronectin 1 promotes melanoma proliferation and metastasis by inhibiting apoptosis and regulating EMT.* **Onco Targets Ther.** 2019;12:3207-21.
167. Xiong D, Wang Y, You M. *A gene expression signature of TREM2(hi) macrophages and gammadelta T cells predicts immunotherapy response.* **Nat Commun.** 2020;11(1):5084.
168. Shuai K, Liu B. *Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system.* **Nat Rev Immunol.** 2003;3(11):900-11.
169. Osborn JL, Greer SF. *Metastatic melanoma cells evade immune detection by silencing STAT1.* **Int J Mol Sci.** 2015;16(2):4343-61.

170. Shirley CA, Chhabra G, Amiri D, Chang H, Ahmad N. *Immune escape and metastasis mechanisms in melanoma: breaking down the dichotomy*. **Front Immunol**. 2024;15:1336023.
171. Brady MS, Eckels DD, Ree SY, Schultheiss KE, Lee JS. *MHC class II-mediated antigen presentation by melanoma cells*. **J Immunother Emphasis Tumor Immunol**. 1996;19(6):387-97.
172. Dhatchinamoorthy K, Colbert JD, Rock KL. *Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation*. **Front Immunol**. 2021;12:636568.
173. Reschke R, Enk AH, Hassel JC. *Chemokines and Cytokines in Immunotherapy of Melanoma and Other Tumors: From Biomarkers to Therapeutic Targets*. **Int J Mol Sci**. 2024;25(12).
174. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. **Science**. 2009;324(5930):1029-33.
175. Arner EN, Rathmell JC. *Metabolic programming and immune suppression in the tumor microenvironment*. **Cancer Cell**. 2023;41(3):421-33.
176. Paijens ST, Vledder A, de Bruyn M, Nijman HW. *Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era*. **Cell Mol Immunol**. 2021;18(4):842-59.
177. Buck MD, O'Sullivan D, Pearce EL. *T cell metabolism drives immunity*. **J Exp Med**. 2015;212(9):1345-60.
178. DePeaux K, Delgoffe GM. *Metabolic barriers to cancer immunotherapy*. **Nat Rev Immunol**. 2021;21(12):785-97.
179. Leone RD, Powell JD. *Fueling the Revolution: Targeting Metabolism to Enhance Immunotherapy*. **Cancer Immunol Res**. 2021;9(3):255-60.
180. Mukherji B. *Immunology of melanoma*. **Clin Dermatol**. 2013;31(2):156-65.
181. Tarhini A, Kudchadkar RR. *Predictive and on-treatment monitoring biomarkers in advanced melanoma: Moving toward personalized medicine*. **Cancer Treat Rev**. 2018;71:8-18.
182. Asher N, Ben-Betzalel G, Lev-Ari S, Shapira-Frommer R, Steinberg-Silman Y, Gochman N, et al. *Real World Outcomes of Ipilimumab and Nivolumab in Patients with Metastatic Melanoma*. **Cancers (Basel)**. 2020;12(8).
183. Hailemichael Y, Johnson DH, Abdel-Wahab N, Foo WC, Bentebibel SE, Daher M, et al. *Interleukin-6 blockade abrogates immunotherapy toxicity and promotes tumor immunity*. **Cancer Cell**. 2022;40(5):509-23 e6.

184. Bobos M. *Histopathologic classification and prognostic factors of melanoma: a 2021 update*. **Ital J Dermatol Venerol**. 2021;156(3):300-21.
185. Liu W, Dowling JP, Murray WK, McArthur GA, Thompson JF, Wolfe R, et al. *Rate of growth in melanomas: characteristics and associations of rapidly growing melanomas*. **Arch Dermatol**. 2006;142(12):1551-8.
186. Cherobin A, Wainstein AJA, Colosimo EA, Goulart EMA, Bittencourt FV. *Prognostic factors for metastasis in cutaneous melanoma*. **An Bras Dermatol**. 2018;93(1):19-26.
187. 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.
188. Michael B. Atkins SJL, Bartosz Chmielowski, Antoni Ribas, Ahmad A. Tahrini, Thach-Giao Truong, Diwakar Davar, Mark Allen O'Rourke, Brendan D. Curti, Joanna M. Brell, Kari Lynn Kendra, Alexandra Ikeguchi, Jedd D. Wolchok, John M. Kirkwood. *DREAMseq (Doublet, Randomized Evaluation in Advanced Melanoma Sequencing): A phase III trial—ECOG-ACRIN EA6134*. In: **2021 ASCO Monthly Plenary Series**; 2021. **Journal of Clinical Oncology**.
189. Patel SP, Othus M, Chen Y, Wright GP, Jr., Yost KJ, Hyngstrom JR, et al. *Neoadjuvant-Adjuvant or Adjuvant-Only Pembrolizumab in Advanced Melanoma*. **N Engl J Med**. 2023;388(9):813-23.
190. Vieira FS. *Judicialization and right to health in Brazil: a trajectory of matches and mismatches*. **Rev Saude Publica**. 2023;57:1.

## ANEXOS

## ANEXO A – Carta de aprovação do CEP



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Inibidores de checkpoint imunológico: imunofenotipagem e desfecho clínico para predição de resposta no Hospital de Câncer de Barretos

**Pesquisador:** Lídia Maria Rebolho Batista Arantes

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 12855019.6.0000.5437

**Instituição Proponente:** Fundação Pio XII

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio  
Fundação Pio XII

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.476.470

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos foram adequadamente apresentados.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem óbices éticos.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital do Amor de Barretos de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, e após a análise das respostas as pendências emitidas, manifesta-se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto. Este projeto está cadastrado no CEP-HCB sob o número 1772/2019.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BARRETOS, 30 de Julho de 2019

Assinado por:  
**Pedro Rafael Martins De Marchi**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hccancerbarretos.com.br

**ANEXO B – Comprovante de submissão: artigo proveniente da Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior**

**The American Journal of Pathology**  
**Pharmacological inhibition of glutamate dehydrogenase 1 (GLUD1) improves functional recovery of neuromuscular junctions and muscle function in Duchenne muscular dystrophy.**  
 --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	AJPA-D-24-00290
<b>Article Type:</b>	Regular Article
<b>Keywords:</b>	Muscular dystrophy; Glutamine metabolism; Macrophages; Neuromuscular junctions; Glutamate Dehydrogenase
<b>Corresponding Author:</b>	Massimiliano Mazzone KU Leuven BELGIUM
<b>First Author:</b>	Andreia Pereira-Nunes
<b>Order of Authors:</b>	Andreia Pereira-Nunes Ummi Ammarah Bruna Pereira Sorroche Himal Sharma Iris Charatsidou Min Shang, PhD Max Nobis, PhD Thibaut Burg, PhD Stijn Verschoren Frédéric Relaix, PhD Alessio Rotini, PhD Ludo Van Den Bosch, PhD Marcello Delfini, PhD Emanuele Berardi, PhD Massimiliano Mazzone, PhD
<b>Abstract:</b>	Presynaptic terminals of neuromuscular junctions (NMJs) are sensitive to glutamate which contributes to NMJ plasticity and synaptic neurotransmission. However, the effect of glutamate on neurotransmission and its pharmacological modulation in muscle pathologies are understudied. Here, we investigated the efficacy of pharmacologic blockade of glutamate dehydrogenase 1 (GLUD1) in mdx mice, a model of Duchenne muscular dystrophy (DMD). The GLUD1 inhibitor R162 mitigated the malfunctioning of NMJs by enhancing glutamate release from muscle fibers and increasing its availability in the muscle interstitium. Glutamate binding to its receptor NMDA on the presynaptic bottom of NMJs resulted in the increased release of acetylcholine and functional recovery of the action potential and muscle contraction, recovering muscle performance. Finally, the same GLUD1 inhibitor did not affect the homeostatic control of NMJs and the behavior of either healthy or dystrophic mice. This study suggests a promising and feasible therapeutic approach to treat DMD, an unmet need in the clinic so far.
<b>Suggested Reviewers:</b>	Fabiola Moretti, PhD Group Leader/ Research Director, National Research Council fabiola.moretti@cnr.it Expert in genetic muscle pathologies  Luca Madaro, PhD

## ANEXO C – Artigo PD-L1 publicado



## Article

---

# PD-L1 Tumor Expression as a Predictive Biomarker of Immune Checkpoint Inhibitors' Response and Survival in Advanced Melanoma Patients in Brazil

---

Bruna Pereira Sorroche, Renan de Jesus Teixeira, Caio Augusto Dantas Pereira, Iara Viana Vidigal Santana, Lazar Vujanovic, Vinicius de Lima Vazquez and Lidia Maria Rebolho Batista Arantes

## Special Issue

Emerging Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibitors in Tumors

Edited by  
Dr. Honglei Chen, Dr. Hitoshi Dejima and Dr. Min Peng



<https://doi.org/10.3390/diagnostics13061041>

## Article

# PD-L1 Tumor Expression as a Predictive Biomarker of Immune Checkpoint Inhibitors' Response and Survival in Advanced Melanoma Patients in Brazil

Bruna Pereira Sorroche <sup>1</sup>, Renan de Jesus Teixeira <sup>1</sup>, Caio Augusto Dantas Pereira <sup>2</sup>, Iara Viana Vidigal Santana <sup>3</sup>, Lazar Vujanovic <sup>4,5</sup>, Vinicius de Lima Vazquez <sup>1,6</sup> and Lidia Maria Rebolho Batista Arantes <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos 14784-400, Brazil; brusorroche@hotmail.com (B.P.S.)

<sup>2</sup> Department of Clinical Oncology, Barretos Cancer Hospital, Barretos 14784-400, Brazil

<sup>3</sup> Department of Pathology, Barretos Cancer Hospital, Barretos 14784-400, Brazil

<sup>4</sup> UPMC Hillman Cancer Center, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15260, USA

<sup>5</sup> Department of Otolaryngology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15260, USA

<sup>6</sup> Melanoma, Sarcoma, and Mesenchymal Tumors Surgery Department, Barretos Cancer Hospital, Barretos 14784-400, Brazil

\* Correspondence: lirebolho@hotmail.com

**Abstract:** Immune checkpoint blockade (ICB) agents are prominent immunotherapies for the treatment of advanced melanoma. However, they fail to promote any durable clinical benefit in a large cohort of patients. This study assessed clinical and molecular predictors of ICB response and survival in advanced melanoma. A retrospective analysis was performed on 210 patients treated with PD-1 or CTLA-4 inhibitors at Barretos Cancer Hospital, Brazil. PD-L1 expression was assessed by immunohistochemistry using formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissues collected prior to ICB therapy. Patients were divided into responders (complete and partial response and stable disease for more than 6 months) and non-responders (stable disease for less than 6 months and progressive disease). Among them, about 82% underwent anti-PD-1 immunotherapy, and 60.5% progressed after the ICB treatment. Patients that received ICB as first-line therapy showed higher response rates than previously treated patients. Higher response rates were further associated with superficial spreading melanomas and positive PD-L1 expression (>1%). Likewise, PD-L1 positive expression and *BRAF* V600 mutations were associated with a higher overall survival after ICB therapy. Since ICBs are expensive therapies, evaluation of PD-L1 tumor expression in melanoma patients should be routinely assessed to select patients that are most likely to respond.

**Keywords:** melanoma; immune checkpoint blockade; response; PD-L1 expression



**Citation:** Sorroche, B.P.; Teixeira, R.d.J.; Pereira, C.A.D.; Santana, I.V.V.; Vujanovic, L.; Vazquez, V.d.L.; Arantes, L.M.R.B. PD-L1 Tumor Expression as a Predictive Biomarker of Immune Checkpoint Inhibitors' Response and Survival in Advanced Melanoma Patients in Brazil.

*Diagnostics* **2023**, *13*, 1041.

<https://doi.org/10.3390/diagnostics13061041>

diagnostics13061041

Academic Editor: Sung Chul Lim

Received: 24 December 2022

Revised: 15 February 2023

Accepted: 7 March 2023

Published: 9 March 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Cancer is considered a worldwide public health concern that affects a significant and growing number of individuals, especially among developing countries [1]. The recent success of immunomodulatory agents in patients with refractory solid tumors demonstrates that activating the immune system is effective as a therapeutic modality [2]. However, tumor cells develop mechanisms to evade recognition and activation of the immune response in a dynamic process called immunoediting [2].

Melanoma is the most aggressive type of skin cancer [3,4], responsible for 325,000 new cases and 57,000 deaths worldwide in 2020 [5]. The treatment for advanced melanomas may involve complex surgery, radiation therapy, and various systemic therapeutic approaches [6]. When the tumor is diagnosed at stage III, the 5-year overall survival rate is 66.5%, while for cases at stage IV, it is around 25.0% [7]. In the last decade, the use of immune checkpoint blockade (ICB) agents has significantly improved melanoma patients'

survival outcomes [8–10]. Nevertheless, about 30% of these patients benefit from the treatment as monotherapy [11,12], and the cellular and molecular aspects associated with this response need to be further elucidated [13].

Previous studies have identified an increased expression of programmed death-ligand 1 (PD-L1) on tumor cells as the most common biomarker to predict response to ICB [14,15]. However, the use of this marker is controversial due to the overall survival benefit of ICB regardless of PD-L1 tumor expression levels [16,17].

As in the wider world, ICB has been gaining ground in Brazil [18]. Thus, this study aimed to investigate the PD-L1 tumor expression profile as a predictive biomarker of response to ICB therapy in Brazilian patients with advanced melanoma in a real-world scenario. Here, we demonstrated that the use of PD-L1, together with clinical information, could be implemented in the clinical setting to identify patients that might benefit from ICB treatments.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Patients

We selected 210 consecutive patients with advanced melanoma who underwent immunotherapy treatment with antibodies against programmed cell death protein 1 (PD-1) and/or cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) at Barretos Cancer Hospital (BCH) between January 2011 and December 2021.

Epidemiological, clinical, and anatomopathological data were collected from medical records and internal data management systems. Clinical response was assessed by clinical oncologists based on the routine radiological evaluation. Patients were subjected to positron emission tomography with computed tomography (PET/CT) every 3 months for disease follow-up and treatment response evaluation. In addition, when brain metastasis was suspected, the patients underwent magnetic resonance imaging (MRI). Inclusion criteria included every advanced melanoma patient with irresectable (stage III) or metastatic (stage IV) disease treated with ICB, with biological tumor samples available. Patients without measurable disease, treated with ICB in the adjuvant setting, were excluded from this study.

### 2.2. PD-L1 Tumor Expression

The most representative areas of the formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor tissues were selected for PD-L1 expression analysis by immunohistochemistry (IHC). Samples from all patients were collected prior to ICB treatment. The reaction was performed using the Benchmark<sup>®</sup> ULTRA platform using the rabbit anti-PD-L1 monoclonal antibody (clone E1L3N, 1:200 dilution, Cell Signaling Technology). The Optiview DAB visualization system was used for PD-L1 protein detection in 5 µm sections, according to the manufacturer's specifications. A minimum of 100 viable tumor cells on the slide was required for an adequate evaluation of PD-L1.

PD-L1 expression was determined by a specialized pathologist using two scores: the tumor proportion score (TPS) and the combined positive score (CPS). The TPS evaluates the percentage of viable tumor cells that show partial or complete membrane staining at any intensity. The CPS evaluates the total number of PD-L1-positive stained cells (tumor and immune system cells) among the total number of viable tumor cells on the slide. Both indexes range from 0 to 100% and were considered positive when greater than or equal to 1%.

### 2.3. BRAF and NRAS Mutation Status

BRAF and NRAS mutation status were evaluated by next-generation sequencing using the TruSight Tumor 15 panel on MiSeq instrument (Illumina, San Diego, CA, USA), as previously described [19]. When DNA quality did not allow reliable sequencing results, BRAF mutation was evaluated by real-time PCR using the Cobas4800 BRAF V600 Mutation

Test assay in the Cobas4800 system (Roche Molecular Diagnostics, Switzerland), following the manufacturer's instructions.

#### 2.4. Statistical Analysis

The statistical software SPSS 23.0 was used for data entry and statistical analysis. Patients with partial (PR), complete response (CR), and stable disease (SD) for more than 6 months were considered as responders to ICB treatment, whereas patients with progressive (PD) and SD for less than 6 months were considered non-responders. Clinical and molecular predictors of ICB response and survival in advanced melanoma were investigated. Survival rates were assessed using the Kaplan–Meier method, and curves were compared using the log-rank test. Multivariate analyses were performed by the logistic regression method, with treatment response as the dependent variable.  $p$ -values  $\leq 0.05$  were considered significant.

### 3. Results

#### 3.1. Clinicopathological Data

About 59% of the patients were male and 86.2% were Caucasian. The median age at diagnosis was 53 (ranging from 19–91) years old. The main primary tumor site was the lower limbs (31.4%) followed by the trunk (21.4%). Most patients (81.9%) were treated with anti-PD-1 agents in monotherapy, and 60.5% of them showed disease progression after ICB treatment. Patients were divided into two groups, responders *vs.* non-responders, comprising 83 and 127 patients, respectively. Additional patient information is presented in Table 1.

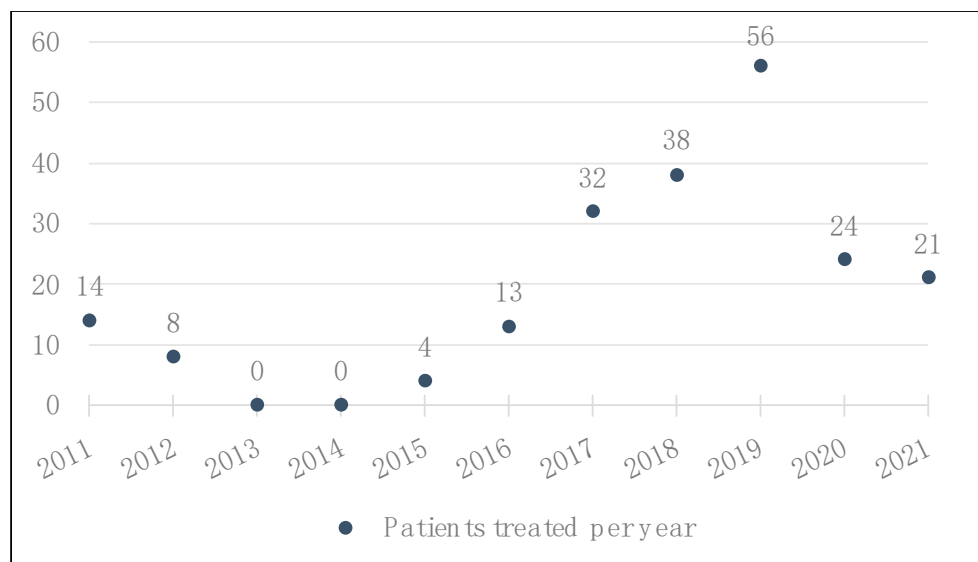
**Table 1.** Clinicopathological and treatment characteristics of the 210 advanced melanoma patients undergoing immune checkpoint blockade, by patient response groups.

Characteristic	Category	All Patients <i>n</i> = 210 (%)	Responders <i>n</i> = 83 (%)	Non-Responders <i>n</i> = 127 (%)	<i>p</i> -Value
Sex	Male	123 (58.6)	47 (56.6)	76 (59.8)	0.669
	Female	87 (41.4)	36 (43.4)	51 (40.2)	
Race	Caucasian	181 (86.2)	71 (85.5)	110 (86.6)	0.827
	Non-Caucasian	24 (11.4)	10 (12.0)	14 (11.0)	
	Missing	5 (2.4)	2 (2.4)	3 (2.4)	
Primary tumor site	Lower limbs	66 (31.4)	20 (24.1)	46 (36.2)	0.245
	Trunk	45 (21.4)	23 (27.7)	22 (17.3)	
	Head and neck	39 (18.6)	15 (18.1)	24 (18.9)	
	Upper limbs	22 (10.5)	10 (12.0)	12 (9.4)	
	Other	9 (4.3)	2 (2.4)	7 (5.5)	
	Primary unknown	29 (13.8)	13 (15.7)	16 (12.6)	
Histological subtype	Nodular	38 (18.1)	15 (18.1)	23 (18.1)	0.020
	Acral lentiginous	37 (17.6)	11 (13.3)	26 (20.5)	
	Superficial spreading	31 (14.8)	20 (24.1)	11 (8.7)	
	Other	22 (10.5)	7 (8.4)	15 (11.8)	
	Missing	82 (39.0)	30 (36.1)	52 (40.9)	
Pathological staging	III	9 (4.3)	2 (2.4)	7 (5.5)	0.249
	IVa	32 (15.2)	10 (12.0)	22 (17.3)	
	IVb	52 (24.8)	26 (31.3)	26 (20.4)	
	IVc	58 (27.6)	20 (24.1)	38 (29.9)	
	IVd	36 (17.1)	12 (14.5)	24 (18.9)	
	Missing	23 (11.0)	13 (15.7)	10 (7.9)	
BRAF status	V600 mutated	77 (36.7)	38 (45.8)	39 (30.7)	0.132
	Wild Type (WT)	106 (50.5)	40 (48.2)	66 (52.0)	
	Missing	27 (12.9)	5 (6.0)	22 (17.3)	

**Table 1.** *Cont.*

Characteristic	Category	All Patients <i>n</i> = 210 (%)	Responders <i>n</i> = 83 (%)	Non-Responders <i>n</i> = 127 (%)	<i>p</i> -Value
NRAS status	Mutated	10 (4.8)	2 (2.4)	8 (6.3)	0.094
	WT	67 (31.9)	34 (41.0)	33 (26.0)	
	Missing	134 (63.3)	47 (56.6)	86 (67.7)	
Treatment agent	Nivolumab (anti-PD-1)	116 (55.2)	49 (59.0)	67 (52.8)	<b>0.021</b>
	Pembrolizumab (anti-PD-1)	56 (26.7)	24 (28.9)	32 (25.2)	
	Ipilimumab (anti-CTLA-4)	28 (13.3)	4 (4.8)	24 (18.9)	
	Nivolumab + NKTR-214 (IL-2 agonist)	8 (3.8)	4 (4.8)	4 (3.1)	
	Nivolumab + ipilimumab	2 (1.0)	2 (2.4)	0 (0.0)	
Treatment agent grouped	Anti-PD1	172 (81.9)	73 (88.0)	135 (81.8)	<b>0.009</b>
	Anti-CTLA-4	28 (13.3)	4 (4.8)	24 (18.9)	
	Anti-PD-1 + IL-2 agonist	8 (3.8)	4 (4.8)	4 (3.1)	
	Anti-PD-1 + anti-CTLA-4	2 (1.0)	2 (2.4)	0 (0.0)	
ICB treatment line	First	113 (53.8)	56 (67.5)	57 (44.9)	<b>0.001</b>
	Second	67 (31.9)	23 (27.7)	44 (34.6)	
	Greater than or equal to third	30 (14.3)	4 (4.8)	26 (20.5)	
Treatment response	Disease progression (DP)	127 (60.5)	0 (0.0)	127 (100.0)	<b>&lt;0.001</b>
	Stable disease (SD)	34 (16.2)	34 (41.0)	0 (0.0)	
	Partial response (PR)	36 (17.1)	36 (43.4)	0 (0.0)	
	Complete response (CR)	13 (6.2)	13 (15.7)	0 (0.0)	

We observed an increase in indications for ICB at BCH from 2014 until 2019 (Figure 1). However, there was a drop in the number of patients starting treatment with ICB in 2020 due to the impact of the SARS-CoV-2 pandemic on the Brazilian National Health System [20], which made access to this high-cost medication more challenging.



**Figure 1.** Total number of patients with advanced or metastatic melanoma who received treatment with ICB at BCH, by year.

### 3.2. PD-L1 Expression Analysis

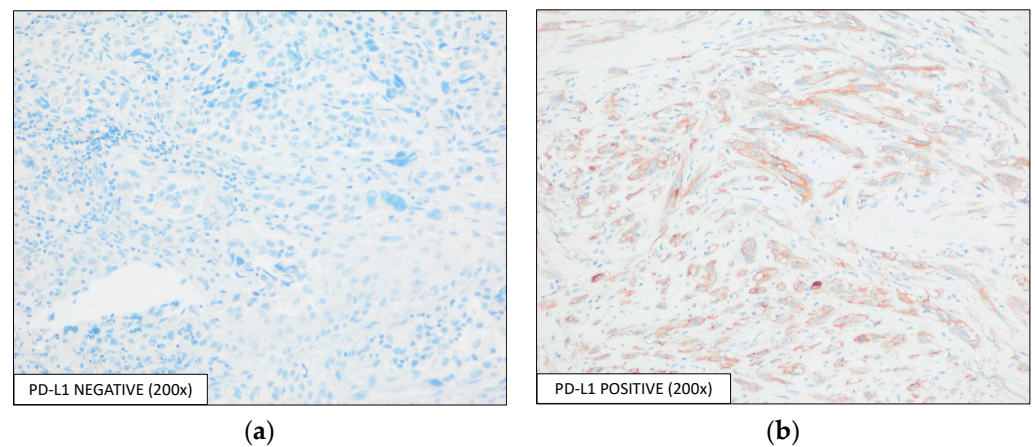
All 210 patients were subjected to PD-L1 expression analysis. The source of samples depended on the availability of FFPE blocks in the Department of Pathology. Approximately

fifty-four percent of the patients had samples from their primary tumor, while for the remaining patients, only metastatic tumor tissue samples were available (Table 2).

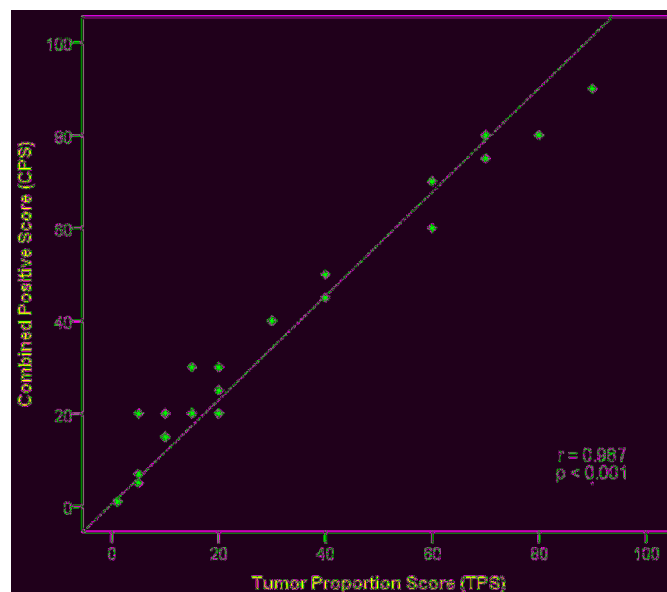
**Table 2.** Origin of tumor tissue samples from patients.

Source of FFPE Sample	n (%)
Primary tumor	113 (53.8)
Subcutaneous metastasis	59 (28.1)
Lymph nodal metastasis	21 (10.0)
Metastasis in other organs	17 (8.1)

The evaluation of PD-L1 expression was performed using two scores, TPS and CPS: 44 (21.0%) samples were considered positive by both scoring methods, while 166 (79.0%) samples were considered negative for PD-L1 expression (IHC represented by Figure 2), with a positive correlation between the two scores (Pearson correlation = 0.987,  $p < 0.001$ , Figure 3).



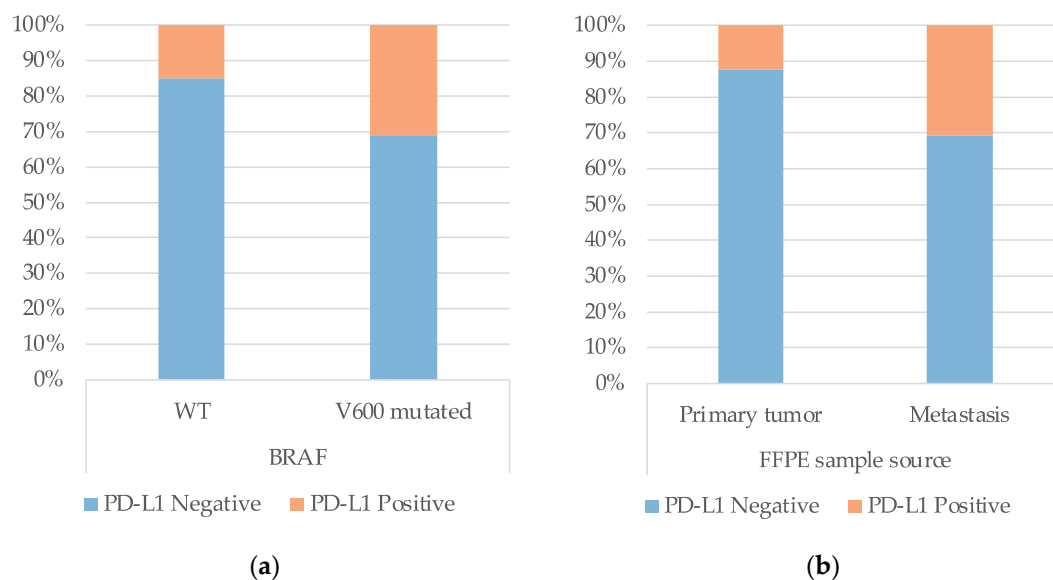
**Figure 2.** Detection of PD-L1 expression by IHC using the E1L3N antibody, with an optical magnification of 200 $\times$ . Representative images of PD-L1-(a) negative and -(b) positive expressions are shown.



**Figure 3.** Pearson correlation analysis between TPS and CPS scores to evaluate PD-L1 expression in advanced melanoma patients' samples.

The PD-L1 expression was associated with BRAF V600 mutation status, where 31.2% (24/77) of the patients with mutations in this gene presented PD-L1 positive samples,

compared to 15.1% (16/106) of BRAF WT tumors ( $p = 0.011$ , Figure 4a). PD-L1 expression was also associated with the FFPE sample source, where positive PD-L1 expression was detected in 30.9% (30/97) of the metastatic samples, against 12.4% (14/113) positivity in the primary tumor samples ( $p = 0.001$ , Figure 4b). The other clinical characteristics evaluated were not significantly associated with the PD-L1 expression profile (data not shown).



**Figure 4.** Association of (a) *BRAF* V600 mutation status and (b) source of FFPE tumor samples with PD-L1 expression profile.

### 3.3. Biomarkers of Therapeutic Response and Survival

The clinical characteristics of the patients and the molecular characteristics of the tumor samples were evaluated as predictors of response to ICB treatment. We found that PD-L1 expression lower than 1% in tumor and immune cells, a line of immunotherapeutic treatment other than the first line, an acral lentiginous histological melanoma subtype, and an anti-CTLA-4 treatment as monotherapy were associated with poor responses (Table 1).

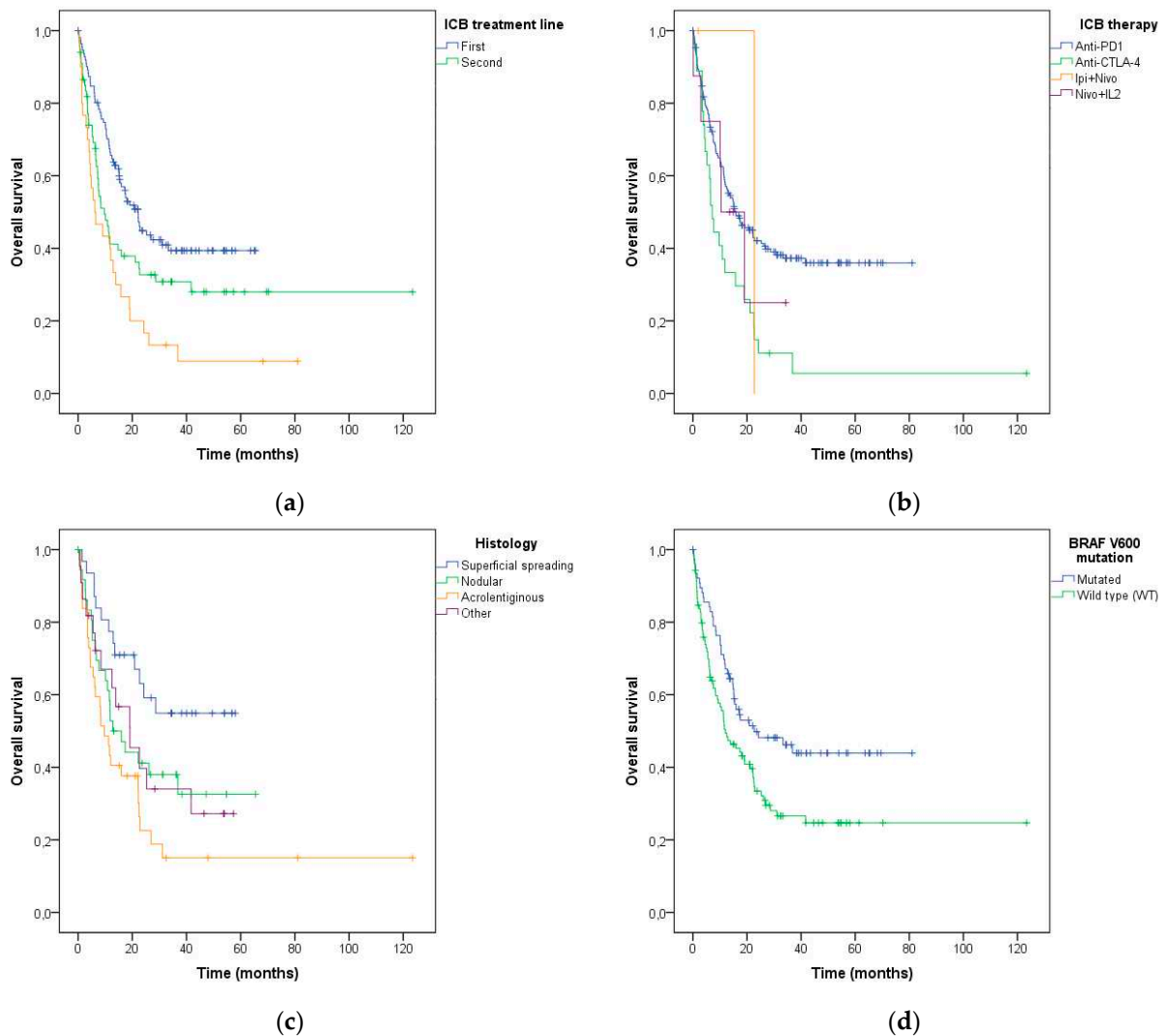
Moreover, the variables of *BRAF* mutation status, ICB treatment agent, ICB treatment line, and PD-L1 expression were included in the multivariate analysis. PD-L1 expression and ICB treatment line remained significant in the model (Table 3). Regarding PD-L1 expression analysis, 85.8% (109/127) of the non-responder patients presented less than 1% of PD-L1 tumor and immune cells' expression, whereas 31.3% (26/83) of the responder patients presented higher expression (>1%) of this protein with both TPS and CPS methods ( $p = 0.005$ ). In addition, patients treated with ICB therapy as the first line of systemic treatment had higher response rates when compared with patients treated in subsequent lines (49.6% vs. 34.3% in the second line and 13.3% in the third line;  $p = 0.001$ ).

Kaplan–Meier survival curves were used to estimate the overall survival of the patients after ICB treatment initiation, according to the characteristics described above. Lower survival was associated with the line of the ICB treatment (log-rank  $p < 0.001$ ; Figure 5a), the type of ICB used (log-rank  $p = 0.013$ ; Figure 5b), the histological melanoma subtype (log-rank  $p = 0.009$ ; Figure 5c), *BRAF* V600 mutation status (log-rank  $p = 0.009$ ; Figure 5d) and PD-L1 expression (log-rank  $p = 0.049$ ; Figure 5e).

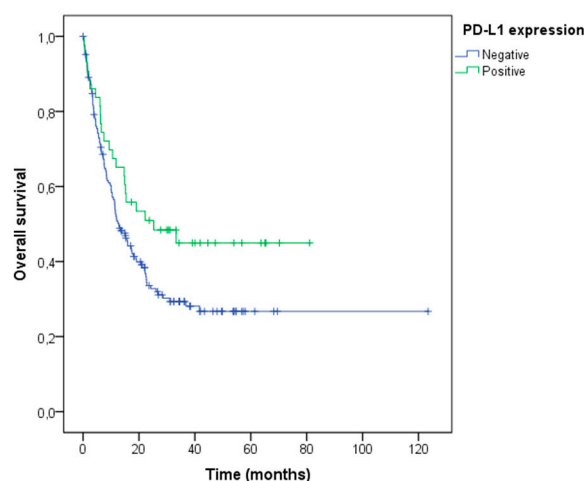
Since melanoma patients are treated with ICB therapies in the metastatic setting, we performed the same association analyses using only the metastatic samples ( $n = 97$ ). The ICB treatment line and PD-L1 expression were also associated with the patient's treatment response ( $p = 0.03$  and  $p = 0.004$ , respectively) and overall survival ( $p = 0.153$  and  $p = 0.026$ , respectively), showing that irrespective of the tumor sample type, PD-L1 expression maintains its relevance.

**Table 3.** Univariate and multivariate analyses evaluating the effect of clinical and molecular features on the therapeutic response of advanced melanoma patients treated with ICB.

Characteristic	Category	Univariate Analysis <i>p</i> -Value	Regression Coefficient (95% CI)	Multivariate Analysis <i>p</i> -Value
<i>BRAF</i> status	V600 mutated	0.132	Reference	0.420
	Wild Type (WT) <i>Missing</i> = 27		1.297 (0.689–2.444)	
Treatment agent grouped	Anti-PD1	<b>0.009</b>	Reference	0.629
	Anti-CTLA-4		0.712 (0.179–2.824)	0.999
	Anti-PD-1 + Anti-CTLA-4 Anti-PD-1 + IL-2 agonist		0.0 (0.0–0.0) 0.999 (0.227–4.402)	0.999
ICB treatment line	First	<b>0.001</b>	Reference	0.125
	Second		1.651 (0.871–3.132)	<b>0.002</b>
	Greater than or equal to third		6.087 (1.970–18.812)	
PD-L1 expression	Negative ( $\leq 1\%$ ) Positive ( $> 1\%$ )	<b>0.005</b>	Reference 0.394 (0.193–0.803)	<b>0.010</b>



**Figure 5.** Cont.



(e)

**Figure 5.** Association of (a) systemic ICB treatment line, (b) type of ICB, (c) histological melanoma subtype, (d) *BRAF* V600 mutation status, and (e) PD-L1 expression with overall survival after the ICB treatment in advanced melanoma patients.

#### 4. Discussion

This study aimed to characterize the clinical and molecular profile of advanced melanoma patients in a Brazilian population and to identify predictive biomarkers of response to ICB therapies. We demonstrated that PD-L1 expression by either TPS or CPS, the line and agent of immunotherapeutic treatment, the histological melanoma subtype, and *BRAF* V600 mutation status were associated with response and/or overall survival after ICB treatment.

Our immune system uses checkpoint receptors to regulate the duration and extent of immune responses to prevent damage to healthy tissues [21]. To avoid being killed by leukocytes, tumor cells exploit this immunosuppressive mechanism by upregulating checkpoint ligands that engage corresponding receptors expressed on immune cells [22]. An example of the mechanism of immune evasion is the ligation of PD-1 expressed on immune cells to PD-L1 expressed on tumor and tumor-infiltrating immune cells, which leads to effector cell inactivation. Therefore, the blockade of immune checkpoints is an approach through which anti-tumor immunity can be re-activated in the tumor microenvironment [21,22]. These agents have been responsible for the induction of long-lasting objective responses in about 40% of melanoma patients, and for the increase in overall survival in advanced-stage melanoma patients [12,23], as well as other tumor types such as non-small cell lung cancer [24], renal cancer [25] and head and neck squamous cell carcinoma [26]. Despite the higher response rates to ICB in comparison with chemotherapy, a large cohort of patients are refractory or acquire resistance to these therapies. Characterization of ICB resistance mechanisms would allow for superior selection of patients that would benefit from these therapies, and for the generation of novel ICB combinations that would benefit a wider population of patients. These developments would lead to more cost- and therapeutically effective ICB strategies [13], which is especially important in Brazil, where most of the healthcare system is public.

There is a growing need for viable biomarkers to be used in the day-to-day life of an oncologic center, wherein the cost must be feasible for expansion to the entire population. Ayers et al. analyzed the expression of a panel of genes using tumor cells from patients treated with pembrolizumab, and identified signatures related to the immune system which correlated to the clinical benefit of the treatment [13]. Another study demonstrated that global mutational load, neoantigen load, and expression of cytolytic markers in the tumor microenvironment were significantly associated with response in patients with advanced melanoma treated with ipilimumab [27]. Goodman et al. found that tumors with a high

mutational load, such as melanoma, are more likely to respond to treatment [28]. Additionally, body mass index (BMI) can be used as a predictor of response to immunotherapy, where obese patients with advanced melanoma respond better, showing greater overall and progression-free survival after treatment with ICBs when compared to non-obese patients [29–31]. Unfortunately, all of the aforementioned, except for BMI, are limited by cost for the entire population.

In clinical trials, PD-L1 tumor expression is considered a poor predictor of objective response to checkpoint inhibition, where patients benefit from the treatment independently of PD-L1 expression levels detected in tumor samples [12,23,32]. This can be explained by its dynamic and heterogeneous expression [33,34], which varies upon disease progression [35] and different treatment protocols, including ICB [36]. Moreover, there are several reasons that could explain the heterogeneity in levels of PD-L1 expression as a predictable biomarker of response: differences in tissue samples, PD-L1 expression cut-off, the use of TPS or CPS, as well as the detection technique used. In this study, 34.3% of patients with negative PD-L1 expression presented objective responses after the ICB treatment, suggesting its use should be combined with other relevant clinical techniques in the practice of the specialty, thus allowing for better prognostic outlining as well as the development of new therapeutic schemes to contribute to improvements in survival rates and the quality of life of these patients. Patient stratification is particularly important to prevent patients who will not benefit from certain treatments from undergoing them, thereby avoiding toxicity, allowing time for other treatments to be considered, and saving on the cost of treatments.

To the best of our knowledge, this is the first study evaluating the PD-L1 tumor expression and clinicopathological data of the Brazilian advanced-stage melanoma population, and their association with ICB response, in a real-world scenario. Here, we validated some previously reported biomarkers such as PD-L1 tumor and immune cells' expression [37], and *BRAF* V600 mutations [38], in a very heterogeneous population. Our results are also in accordance with other studies [10,38] in which patients receiving anti-PD1 monotherapy or a combination of anti-PD1 and anti-CTLA-4 responded better than those patients treated with anti-CTLA-4 alone. Moreover, a recent clinical trial has demonstrated that using ICB as first line is beneficial for advanced melanoma patients [39], and new ICB combinations show greater treatment outcomes [40].

One limitation of this study is the fact that most of the samples for PD-L1 analysis were from the primary tumors and not from the metastatic sites. This is due to the study's retrospective nature and the difficulty of obtaining samples from visceral organs in which most melanoma metastases are located. Prospective studies are needed to validate our findings.

In conclusion, due to high ICB cost constraints, biomarker-driven selection of advanced melanoma patients should be implemented as a routine practice to predict treatment response as well as overall survival. This would reduce costs and improve the therapeutic efficacy of ICB therapies.

**Author Contributions:** Conceptualization, B.P.S. and L.M.R.B.A.; methodology, B.P.S., I.V.V.S. and C.A.D.P.; software, B.P.S. and R.d.J.T.; validation, B.P.S.; formal analysis, I.V.V.S.; investigation, B.P.S., R.d.J.T., C.A.D.P. and L.V.; resources, V.d.L.V. and L.M.R.B.A.; data curation, L.M.R.B.A.; writing—original draft preparation, B.P.S. and R.d.J.T.; writing—review and editing, C.A.D.P., I.V.V.S., L.V., V.d.L.V. and L.M.R.B.A.; supervision, V.d.L.V. and L.M.R.B.A.; project administration, L.M.R.B.A.; funding acquisition, L.M.R.B.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grant number 2019/07111-9. B.S. was a recipient of two scholarships from FAPESP (2019/03570-9 and 2021/10922-9). L.A. was a recipient of a scholarship from FAPESP (2021/04100-6). L.A. and V.d.L.V. were recipients of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) productivity.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the National Health Council's Resolution 466/2012 and approved by the Institutional Ethics Committee of Barretos Cancer Hospital (1772/2019).

**Informed Consent Statement:** Patient consent was waived due to the retrospective aspect of the study, the minimal risk to the participants, and considering that its development does not result in an impact on clinical management or the need for genetic counseling.

**Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are available upon request from the authors.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Bray, F.; Soerjomataram, I. The Changing Global Burden of Cancer: Transitions in Human Development and Implications for Cancer Prevention and Control. In *Disease Control Priorities: Cancer*, 3rd ed.; The World Bank: Washington, DC, USA, 2015; Volume 3.
2. Moskovitz, J.M.; Ferris, R.L. Tumor Immunology and Immunotherapy for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J. Dent. Res.* **2018**, *97*, 622–626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J. Clin.* **2017**, *67*, 7–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. American Cancer Society. *About Basal and Squamous Cell Skin Cancer*; American Cancer Society: Atlanta, GA, USA, 2016.
5. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [[CrossRef](#)]
6. NCCN. National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology—Melanoma: Cutaneous (Version 1.2023). 2022. Available online: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/cutaneous\\_melanoma.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cutaneous_melanoma.pdf) (accessed on 19 February 2023).
7. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) 17 Registries. Cancer Statistics Factsheets: Melanoma of the Skin: National Cancer Institute. 2022. Available online: [seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html](https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html) (accessed on 18 February 2023).
8. Olszanski, A.J. Current and future roles of targeted therapy and immunotherapy in advanced melanoma. *J. Manag. Care Spec. Pharm.* **2014**, *20*, 346–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Zhu, Z.; Liu, W.; Gotlieb, V. The rapidly evolving therapies for advanced melanoma—Towards immunotherapy, molecular targeted therapy, and beyond. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2016**, *99*, 91–99. [[CrossRef](#)]
10. Larkin, J.; Chiarion-Sileni, V.; Gonzalez, R.; Grob, J.J.; Rutkowski, P.; Lao, C.D.; Cowey, C.L.; Schadendorf, D.; Wagstaff, J.; Dummer, R.; et al. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 1535–1546. [[CrossRef](#)]
11. Ribas, A.; Hamid, O.; Daud, A.; Hodi, F.S.; Wolchok, J.D.; Kefford, R.; Joshua, A.M.; Patnaik, A.; Hwu, W.-J.; Weber, J.S.; et al. Association of Pembrolizumab With Tumor Response and Survival Among Patients With Advanced Melanoma. *JAMA* **2016**, *315*, 1600–1609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Robert, C.; Schachter, J.; Long, G.V.; Arance, A.; Grob, J.J.; Mortier, L.; Daud, A.; Carlino, M.S.; McNeil, C.; Lotem, M.; et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 2521–2532. [[CrossRef](#)]
13. Ayers, M.; Lunceford, J.; Nebozhyn, M.; Murphy, E.; Loboda, A.; Kaufman, D.R.; Albright, A.; Cheng, J.D.; Kang, P.; Shankaran, V.; et al. IFN-gamma-related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J. Clin. Investig.* **2017**, *127*, 2930–2940. [[CrossRef](#)]
14. Xu-Monette, Z.Y.; Zhang, M.; Li, J.; Young, K.H. PD-1/PD-L1 Blockade: Have We Found the Key to Unleash the Antitumor Immune Response? *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1597. [[CrossRef](#)]
15. Patel, S.P.; Kurzrock, R. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14*, 847–856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Goodman, A.; Patel, S.P.; Kurzrock, R. PD-1-PD-L1 immune-checkpoint blockade in B-cell lymphomas. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2017**, *14*, 203–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Grigg, C.; Rizvi, N.A. PD-L1 biomarker testing for non-small cell lung cancer: Truth or fiction? *J. Immunother. Cancer* **2016**, *4*, 48. [[CrossRef](#)]
18. Da Costa, L.M.M.; Crovador, C.S.; de Carvalho, C.E.B.; Vazquez, V.L. Characteristics of Brazilian melanomas: Real-world results before and after the introduction of new therapies. *BMC Res. Notes* **2019**, *12*, 296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Campanella, N.C.; Silva, E.C.; Dix, G.; de Lima Vazquez, F.; Escremim de Paula, F.; Berardinelli, G.N.; Balancin, M.; Chammas, R.; Lopez, R.V.M.; Silveira, H.C.S.; et al. Mutational Profiling of Driver Tumor Suppressor and Oncogenic Genes in Brazilian Malignant Pleural Mesotheliomas. *Pathobiology* **2020**, *87*, 208–216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Ribeiro, C.M.; Correa, F.M.; Migowski, A. Short-term effects of the COVID-19 pandemic on cancer screening, diagnosis and treatment procedures in Brazil: A descriptive study, 2019–2020. *Epidemiol. Serv. Saude.* **2022**, *31*, e2021405. [[CrossRef](#)]

21. Ling, D.C.; Bakkenist, C.J.; Ferris, R.L.; Clump, D.A. Role of Immunotherapy in Head and Neck Cancer. *Semin. Radiat. Oncol.* **2018**, *28*, 12–16. [[CrossRef](#)]
22. Schreiber, R.D.; Old, L.J.; Smyth, M.J. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **2011**, *331*, 1565–1570. [[CrossRef](#)]
23. Robert, C.; Long, G.V.; Brady, B.; Dutriaux, C.; Maio, M.; Mortier, L.; Hassel, J.C.; Rutkowski, P.; McNeil, C.; Kalinka-Warzocha, E.; et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 320–330. [[CrossRef](#)]
24. Garon, E.B.; Rizvi, N.A.; Hui, R.; Leighl, N.; Balmanoukian, A.S.; Eder, J.P.; Patnaik, A.; Aggarwal, C.; Gubens, M.; Horn, L.; et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 2018–2028. [[CrossRef](#)]
25. Motzer, R.J.; Rini, B.I.; McDermott, D.F.; Redman, B.G.; Kuzel, T.M.; Harrison, M.R.; Vaishampayan, U.N.; Drabkin, H.A.; George, S.; Logan, T.F.; et al. Nivolumab for Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase II Trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 1430–1437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bauml, J.; Seiwert, T.Y.; Pfister, D.G.; Worden, F.; Liu, S.V.; Gilbert, J.; Saba, N.F.; Weiss, J.; Wirth, L.; Sukari, A.; et al. Pembrolizumab for Platinum- and Cetuximab-Refractory Head and Neck Cancer: Results From a Single-Arm, Phase II Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 1542–1549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Van Allen, E.M.; Miao, D.; Schilling, B.; Shukla, S.A.; Blank, C.; Zimmer, L.; Sucker, A.; Hillen, U.; Foppen, M.H.G.; Goldinger, S.M.; et al. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science* **2015**, *350*, 207–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Goodman, A.M.; Kato, S.; Bazhenova, L.; Patel, S.P.; Frampton, G.M.; Miller, V.; Stephens, P.J.; Daniels, G.A.; Kurzrock, R. Tumor Mutational Burden as an Independent Predictor of Response to Immunotherapy in Diverse Cancers. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16*, 2598–2608. [[CrossRef](#)]
29. McQuade, J.L.; Daniel, C.R.; Hess, K.R.; Mak, C.; Wang, D.Y.; Rai, R.R.; Park, J.J.; Haydu, L.E.; Spencer, C.; Wongchenko, M.; et al. Association of body-mass index and outcomes in patients with metastatic melanoma treated with targeted therapy, immunotherapy, or chemotherapy: A retrospective, multicohort analysis. *Lancet Oncol.* **2018**, *19*, 310–322. [[CrossRef](#)]
30. Cortellini, A.; Bersanelli, M.; Buti, S.; Cannita, K.; Santini, D.; Perrone, F.; Giusti, R.; Tiseo, M.; Michiara, M.; Di Marino, P.; et al. A multicenter study of body mass index in cancer patients treated with anti-PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors: When overweight becomes favorable. *J. Immunother. Cancer* **2019**, *7*, 57. [[CrossRef](#)]
31. Richtig, G.; Hoeller, C.; Wolf, M.; Wolf, I.; Rainer, B.M.; Schuler, G.; Richtig, M.; Grüber, M.R.; Gappmayer, A.; Haidn, T.; et al. Body mass index may predict the response to ipilimumab in metastatic melanoma: An observational multi-centre study. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0204729. [[CrossRef](#)]
32. Wolchok, J.D.; Chiarion-Sileni, V.; Gonzalez, R.; Rutkowski, P.; Grob, J.J.; Cowey, C.L.; Lao, C.D.; Wagstaff, J.; Schadendorf, D.; Ferrucci, P.F.; et al. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 1345–1356. [[CrossRef](#)]
33. Grossman, J.E.; Vasudevan, D.; Joyce, C.E.; Hildago, M. Is PD-L1 a consistent biomarker for anti-PD-1 therapy? The model of balstilimab in a virally-driven tumor. *Oncogene* **2021**, *40*, 1393–1395. [[CrossRef](#)]
34. Zhao, X.; Bao, Y.; Meng, B.; Xu, Z.; Li, S.; Wang, X.; Hao, R.; Ma, W.; Liu, D.; Zheng, J.; et al. From rough to precise: PD-L1 evaluation for predicting the efficacy of PD-1/PD-L1 blockades. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 920021. [[CrossRef](#)]
35. Boothman, A.M.; Scott, M.; Ratcliffe, M.; Whiteley, J.; Dennis, P.A.; Wadsworth, C.; Sharpe, A.; Rizvi, N.A.; Garassino, M.C.; Walker, J. Impact of Patient Characteristics, Prior Therapy, and Sample Type on Tumor Cell Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Patients with Advanced NSCLC Screened for the ATLANTIC Study. *J. Thorac. Oncol.* **2019**, *14*, 1390–1399. [[CrossRef](#)]
36. Riaz, N.; Havel, J.J.; Makarov, V.; Desrichard, A.; Urba, W.J.; Sims, J.S.; Hodi, F.S.; Martín-Algarra, S.; Mandal, R.; Sharfman, W.H.; et al. Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab. *Cell* **2017**, *171*, 934–949.e16. [[CrossRef](#)]
37. Tarhini, A.; Kudchadkar, R.R. Predictive and on-treatment monitoring biomarkers in advanced melanoma: Moving toward personalized medicine. *Cancer Treat. Rev.* **2018**, *71*, 8–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Asher, N.; Ben-Betzalel, G.; Lev-Ari, S.; Shapira-Frommer, R.; Steinberg-Silman, Y.; Gochman, N.; Schachter, J.; Meirson, T.; Markel, G. Real World Outcomes of Ipilimumab and Nivolumab in Patients with Metastatic Melanoma. *Cancers* **2020**, *12*, 2329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Atkins, M.B.; Lee, S.J.; Chmielowski, B.; Ribas, A.; Tarhini, A.A.; Truong, T.-G.; Davar, D.; O'Rourke, M.A.; Curti, B.D.; Brell, J.M.; et al. DREAMseq (Doublet, Randomized Evaluation in Advanced Melanoma Sequencing): A phase III trial—ECOG-ACRIN EA6134. *J. Clin. Oncol.* **2021**, *39*, 356154. [[CrossRef](#)]
40. Tawbi, H.A.; Schadendorf, D.; Lipson, E.J.; Ascierto, P.A.; Matamala, L.; Castillo Gutierrez, E.; Rutkowski, P.; Gogas, H.J.; Lao, C.D.; De Menezes, J.J.; et al. Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *386*, 24–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

**ANEXO D – Comprovante de submissão: artigo assinatura gênica**

**Journal of Molecular Medicine**  
**CD24, NFIL3, FN1, and KLRK1 signature predicts melanoma immunotherapy response and survival**  
**--Manuscript Draft--**

<b>Manuscript Number:</b>	JMME-D-24-00677
<b>Full Title:</b>	CD24, NFIL3, FN1, and KLRK1 signature predicts melanoma immunotherapy response and survival
<b>Article Type:</b>	Original Article
<b>Corresponding Author:</b>	Lidia Maria Rebolho Batista Arantes, PhD Fundação Pio XII: Hospital de Cancer de Barretos BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Fundação Pio XII: Hospital de Cancer de Barretos
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Bruna Pereira Sorroche, PhD
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Bruna Pereira Sorroche, PhD Renan de Jesus Teixeira, MSc Vinicius Gonçalves de Souza, MD Isabela Cristiane Tosi, BSc Katiane Tostes, BSc Ana Carolina Laus, PhD Iara Viana Vidigal Santana, MD Vinicius de Lima Vazquez, MD, PhD Lidia Maria Rebolho Batista Arantes, PhD
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	Background: Melanoma poses a significant health concern due to its propensity to metastasize and its high mortality rate. Immunotherapy has emerged as a promising treatment strategy for harnessing the patient's immune system to fight tumor cells. However, not all patients respond equally to immunotherapy, highlighting the need for predictive biomarkers to identify potential responders and optimize treatment strategies. Material and methods: Using data from 579 immunology-related genes evaluated by the NanoString nCounter Human Immunology v2 Panel, we integrated transcriptomic data with the clinical characteristics of 35 individuals to develop a predictive signature for immunotherapy response in melanoma patients. Results: Through comprehensive analysis, we identified 18 genes upregulated in non-responder patients and three upregulated in responder patients. In multivariate analysis, CD24, NFIL3, FN1, and KLRK1 were identified as key predictors with significant potential for forecasting treatment outcomes. We then calculated a score incorporating the expression levels of these genes. The score achieved high accuracy in discriminating responders from non-responders, with an area under the curve of 0.935 ( $p < 0.001$ ). The signature was also significantly associated with progression-free survival, overall survival, and survival following immunotherapy ( $p < 0.001$ ). The validation of the signature in two independent cohorts confirmed its robustness and applicability, with areas under the curve of 0.758 ( $p = 0.036$ ) and 0.839 ( $p = 0.003$ ), respectively. Conclusion: This study represents a significant advance in precision medicine for melanoma. By identifying patients unlikely to benefit from immunotherapy, our approach could help optimize treatment allocation and improve patient outcomes.