

**AVALIAÇÃO POR IMAGEM DE MEDIDAS ESPLÊNICAS E
TÍMICAS COMO BIOMARCADORES DE RESPOSTA EM
PACIENTES COM CÂNCER TRATADOS COM IMUNOTERAPIA**

MATEUS DE OLIVEIRA TAVEIRA

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente para obtenção
do Título de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa

São Paulo

2023

Taveira, Mateus de Oliveira.

Avaliação por imagem de medidas esplênicas e tímicas como biomarcadores de resposta em pacientes com câncer tratados com imunoterapia. / Mateus de Oliveira Taveira. São Paulo, 2023.

69f.

Tese de Doutorado - Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa.

1. Imunoterapia, 2. Esplenomegalia, 3. Biomarcador

CDU 616

Nome: Mateus de Oliveira Taveira

Título: Avaliação por imagem de medidas esplênicas e tímicas como biomarcadores de resposta em pacientes com câncer tratados com imunoterapia

Aprovado em: 26/01/2023

Banca Examinadora

Orientador: Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Helano Carioca Freitas

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Romualdo Barroso Sousa

Instituição: DASA Oncologia

Membro da banca: Marcos Duarte Guimaraes

Instituição: Universidade Federal do Vale do São Francisco

Membro da banca: Ramon Andrade Bezerra de Mello

Instituição: Universidade Nove de Julho

*Digo: o real não está na saída nem na chegada:
ele se dispõe para a gente é no meio da travessia.*

João Guimarães Rosa

*Dedicado este trabalho aos meus pais,
que me incentivaram ao estudo, desde a mais tenra idade.*

AGRADECIMENTOS

Aos muitos mentores que sempre tive a sorte de encontrar e me incentivaram a perseguir o caminho da ciência. Na Unicamp, principalmente Dr. Ivan Toro, Dr. Paulo Velho, Dr. Fernando Cendes e Dra. Marcia Morita. Na Harvard, Dra. Gerburg Wulf, Dr. Geoffrey Shapiro e Dr. Romualdo Barroso. No A.C.Camargo, Dr. Almir Bitencourt e minha orientadora de Doutorado, Dra. Paula Pinto.

Ao Departamento de Oncologia Clínica do A.C.Camargo Cancer Center, em especial ao Dr. Miton de Barros e Silva.

Aos membros da banca de qualificação, Dra. Maria Fernanda Almeida e Dr. Daniel Cubero, pelos comentários críticos que melhoraram a qualidade deste projeto.

Aos colegas da residência médica em Radiologia e Diagnóstico por Imagem da turma de 2018-2021, sem os quais não haveria concluído este passo da minha formação.

Aos mentores da residência médica em Radiologia e Diagnóstico por Imagem do A.C.Camargo Cancer Center, pelos ensinamentos.

Aos pacientes do A.C.Camargo Cancer Center, que me ensinaram através dos seus exemplos a ter coragem, mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha esposa Carla, pelo apoio e incentivo contínuos, sem os quais não teria concluído este projeto.

RESUMO

de Oliveira Taveira, Mateus. **Avaliação por imagem de medidas esplênicas e tímicas como biomarcadores de resposta em pacientes com câncer tratados com imunoterapia** [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2023.

INTRODUÇÃO: Em menos de duas décadas, a imunoterapia consolidou-se como um dos pilares do tratamento do câncer. Apesar da sua potencial elevada eficácia e resposta duradoura, a proporção de pacientes que apresentam resposta objetiva é relativamente baixa e existem poucos biomarcadores para selecionar os pacientes com maior potencial de resposta. **OBJETIVO:** Nossa hipótese era de que era possível avaliar globalmente o sistema imune do paciente através da mensuração por imagem do timo e do baço e usar essas métricas como fator prognóstico e preditivo de resposta a bloqueadores de *checkpoint*. **RESULTADOS:** Os principais resultados foram: 1) As medidas tímicas não se correlacionam com a sobrevida em pacientes tratados com imunoterapia; 2) Há aumento do volume esplênico após o uso de imunoterapia na maior parte dos pacientes, mas o grau de aumento não se correlaciona com resposta à terapia; 3) Maior volume esplênico está associado a pior sobrevida livre de progressão em pacientes com melanoma tratados com imunoterapia, mas essa correlação não pôde ser replicada em outros tipos tumorais. **CONCLUSÃO:** a espessura tímica não se correlaciona com desfechos clínicos em pacientes oncológicos tratados com imunoterapia. Menor volume esplênico antes de iniciar imunoterapia está relacionada a melhor prognóstico em pacientes com melanoma, mas não em outros tipos tumorais. **PALAVRAS-CHAVE:** 1. Imunoterapia. 2. Esplenomegalia. 3. Biomarcador.

ABSTRACT

de Oliveira Taveira, Mateus. **Imaging evaluation of thymic and splenic measurements as response biomarkers in cancer patients treated with immunotherapy** [Thesis]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2023.

INTRODUCTION: In less than two decades, immunotherapy has established itself as one of the pillars of cancer treatment. Despite its potentially high efficacy and long-lasting response, the proportion of patients who have an objective response is relatively low and there are few biomarkers to select patients with the greatest response potential. **OBJECTIVE:** Our hypothesis was that it was possible to assess the patient's immune system globally by measuring the thymus and spleen by imaging and using these metrics as a prognostic and predictive factor of response to immune checkpoint inhibitors. **RESULTS:** The main results were: 1) Thymic measurements do not correlate with survival in patients treated with immunotherapy; 2) There is an increase in splenic volume after the use of immunotherapy in most patients, but the degree of increase does not correlate with response to therapy; 3) Greater splenic volume is associated with worse progression free survival in patients with melanoma treated with immunotherapy, but this correlation could not be replicated in other tumor types. **CONCLUSION:** thymic thickness does not correlate with clinical outcomes in cancer patients treated with immunotherapy. Smaller splenic volume before starting immunotherapy is associated with better prognosis in patients with melanoma, but not other tumor types. **KEYWORDS:** 1. Immunotherapy. 2. Splenomegaly. 3. Biomarker.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Desenho esquemático do formato piramidal bilobado do timo em corte axial – página 11

Figura 2 Demonstração da ferramenta Livewire em exame de tomografia – página 12

Figura 3 Resultado em três planos da segmentação esplênica usando a ferramenta Livewire – página 12

Figura 4 Desenho esquemático dos eixos do baço – página 13

Figura 5 Algoritmo de seleção dos sujeitos incluídos na pesquisa – página 18

Figura 6 Gráfico de probabilidades para análise de normalidade da espessura tímica – página 21

Figura 7 Gráfico em violino da espessura tímica antes e após o início da imunoterapia – página 22

Figura 8 Curvas de sobrevida livre de progressão entre os pacientes com timo medindo menos de 13,6 mm e maiores ou iguais a 13,6 mm antes do início da imunoterapia ($P=0,1332$, teste de Log-rank (Mantel-Cox), sobrevida mediana de 8,9 meses nos sujeitos com timo $<13,6$ mm e 13,5 meses nos sujeitos com timo $\geq 13,6$ mm) – página 23

Figura 9 Curvas de sobrevida livre de progressão entre os pacientes com timo medindo menos de 13,7 mm e maiores que 13,7 mm no primeiro exame de avaliação de resposta após o início da imunoterapia ($P=0,5297$, teste de Log-rank (Mantel-Cox), sobrevida mediana de 10,3 meses nos sujeitos com timo $<13,7$ mm e 13,3 meses nos sujeitos com timo $>13,7$ mm no primeiro exame de avaliação de resposta após imunoterapia) – página 24

Figura 10 Curvas de sobrevida livre de progressão entre os pacientes que tiveram diminuição da espessura tímica e aqueles que tiveram estabilidade ou aumento da espessura tímica na análise comparativa entre o exame antes e após o início da imunoterapia ($P=0,0603$, teste de Log-rank (Mantel-Cox), sobrevida mediana de 15,4 meses nos sujeitos que apresentaram

redução do timo e 8,3 meses nos sujeitos cujo timo permaneceu igual ou aumentou) – página 24

Figura 11 Gráfico de probabilidades para análise de normalidade do volume esplênico – página 26

Figura 12 Gráfico em violino do volume esplênico antes e após o início da imunoterapia – página 27

Figura 13 Curvas de sobrevida livre de progressão entre os pacientes com baço medindo menos de 209 cm³ e maiores ou iguais a 209 cm³ antes do início da imunoterapia (P=0,9905, teste de Log-rank (Mantel-Cox), sobrevida mediana de 11,1 meses nos sujeitos com volume esplênico menor que 209 cm³ e 11,0 meses nos sujeitos com volume esplênico maior que 209 cm³) – página 29

Figura 14 Curvas de sobrevida livre de progressão entre os pacientes com baço medindo menos de 212 cm³ e maiores ou iguais a 212 cm³ no primeiro exame de avaliação de resposta após o início da imunoterapia (P=0,3867, teste de Log-rank (Mantel-Cox), sobrevida mediana de 9,9 meses nos sujeitos com volume esplênico menor que 212 cm³ e 12,7 meses nos sujeitos com volume esplênico maior que 212 cm³) – página 29

Figura 15 Curvas de sobrevida livre de progressão entre os pacientes que tiveram diminuição do volume esplênico e aqueles que tiveram aumento do volume esplênico na análise comparativa entre o exame antes e após o início da imunoterapia (P=0,9295, teste de Log-rank (Mantel-Cox), sobrevida mediana de 12,2 meses nos sujeitos com redução do volume esplênico e 11,1 meses nos sujeitos com aumento) – página 30

Figura 16 Curvas de sobrevida livre de progressão nos pacientes com neoplasia pulmonar e carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço – página 32

Figura 17 Curvas de sobrevida livre de progressão entre os pacientes com melanoma (n=50) e baço medindo menos de 222 cm³ e mais de 222 cm³ no exame antes do início da imunoterapia. A sobrevida mediana foi de 24,0 meses nos pacientes com baços menores que 222 cm³ e de 11,0 meses nos pacientes com baços maiores que 222 cm³ no exame pré-tratamento (P=0,0184, teste de Log-rank (Mantel-Cox)) – página 34

Figura 18 Curvas de sobrevida livre de progressão entre os pacientes com melanoma (n=50) e baço medindo menos de 246 cm³ e mais de 246 cm³ no primeiro exame de avaliação de resposta após o início da imunoterapia. A sobrevida mediana foi de 11,0 meses nos pacientes com baços maiores que 246 cm³ e não foi atingida nos pacientes com baços menores que 246 cm³ no exame pré-tratamento (P=0,0058, teste de Log-rank (Mantel-Cox)) – página 34

Figura 19 Curva COR contendo os valores do volume esplênico antes e após o início da imunoterapia para diagnóstico de bons respondedores (sobrevida livre de progressão maior que 487 dias) versus maus respondedores (sobrevida livre de progressão menor que 487 dias) – página 35

Figura 20 - SUVmax do timo e baço antes e após início da imunoterapia – página 37

Figura 21 - Curvas de sobrevida livre de progressão conforme o SUVmax tímico antes e no primeiro exame de avaliação de resposta após o início da imunoterapia – página 38

Figura 22 - Curvas de sobrevida livre de progressão conforme o SUVmax esplênico antes e no primeiro exame de avaliação de resposta após o início da imunoterapia – página 39

Figura 23 Gráfico XY da volumetria esplênica semiautomática versus valores calculados pela fórmula tridimensional– página 41

Figura 24 Gráfico XY da volumetria esplênica semiautomática versus valores calculados pela fórmula baseada no comprimento craniocaudal – página 42

Figura 25 Gráfico XY da volumetria esplênica semiautomática versus largura L – página 42

Figura 26 Gráfico XY da volumetria esplênica semiautomática versus espessura E1 – página 43

Figura 27 Gráfico XY da volumetria esplênica semiautomática versus espessura tímica – página 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Dados coletados dos prontuários eletrônicos e do PACS – página 14

Tabela 2 Dados clínicos dos sujeitos incluídos – página 19

Tabela 3 Estatística descritiva da espessura tímica – página 21

Tabela 4 Estatística descritiva do volume esplênico – página 27

Tabela 5 Correlação entre a volumetria esplênica semiautomática, medidas esplênicas unidimensionais e fórmulas para cálculo do volume baseadas nas medidas unidimensionais – página 40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

18F-FDG	fluorodesoxiglicose (2-desoxi-2-(18F)fluoro-D-glicose de acordo com nomenclatura IUPAC)
anti-CTLA4	anticorpo contra proteína associada a linfócito T citotóxico 4
anti-PD-1	anticorpo contra proteína de morte celular programada 1
anti-PD-L1	anticorpo contra ligante de morte celular programada 1
C	comprimento crânio-caudal esplênico
CEC	carcinoma espinocelular
COR	característica de operação do receptor
CTLA-4	proteína associada a linfócito T citotóxico 4 (do inglês cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)
E1	espessura esplênica no eixo axial
FDA	agência regulatória americana de medicamentos, equivalente à Vigilância Sanitária brasileira, em tradução literal Administração de Comidas e Drogas (do inglês Food and Drug Administration)
HR	razão de riscos (do inglês hazard ratio)
imRECIST	do inglês Immune-Modified Response Evaluation Criteria in Solid Tumours)
iRECIST	do inglês immune Response Evaluation Criteria in Solid Tumours
irRC	do inglês immune-related Response Criteria
irRECIST	do inglês immune-related Response Evaluation Criteria in Solid Tumours
L	largura esplênica no eixo axial
MDSC	células supressoras derivadas da linhagem mieloide (do inglês myeloid-derived suppressor cell)

PACS	sistema de arquivamento e comunicação de imagens (do inglês Picture Archiving and Communication System)
PD-1	proteína de morte celular programada 1 (do inglês programmed cell death protein 1)
PD-L1	ligante de morte celular programada 1 (do inglês programmed death-ligand 1)
PET/CT	tomografia por emissão de prótons/tomografia computadorizada (do inglês positron emission tomography/computed tomography)
REDCap	software de captura de dados eletrônicos (do inglês Research Electronic Data Capture)
SUV	valor de captação padronizado (do inglês standard uptake value)
SUVmean	valor de captação padronizado médio
SUVmax	máximo valor de captação padronizado
VOI	volume de interesse (do inglês volume of interest)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Justificativa	4
2	OBJETIVOS	6
2.1	Objetivo geral.....	6
2.2	Objetivos específicos	6
3	METODOLOGIA	7
3.1	Desenho do estudo.....	7
3.2	Aspectos éticos.....	7
3.3	População do estudo.....	8
3.4	Critérios de inclusão.....	8
3.5	Critérios de exclusão.....	8
3.6	Seleção dos pacientes.....	9
3.7	Mensuração do timo.....	10
3.8	Mensuração do baço.....	11
3.9	Variáveis do estudo.....	14
3.10	Análise estatística.....	16
3.11	Hipóteses e resultados esperados.....	16

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1	Análise descritiva.....	18
4.2	Medidas tímicas em pacientes submetidos a imunoterapia.....	20
4.3	Medidas esplênicas em pacientes submetidos a imunoterapia.....	25
4.4	Subanálise por tipo de neoplasia.....	31
4.5	Análise secundária dos exames de PET/CT.....	36
4.6	Correlação da volumetria com medidas unidimensionais.....	39
4.7	Discussão.....	44
5	CONCLUSÕES	53
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
7	REFERÊNCIAS	55

ANEXOS

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP (projeto original)
– página 62

Anexo 2 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP (mudança do projeto) – página 65

Anexo 3 – Comprovante de aceitação de manuscrito para publicação – página 69

1 INTRODUÇÃO

Baseado no princípio da não-maleficência, que afirma que ao médico, antes mesmo de fazer o bem ao paciente é necessário não o causar mal, a Medicina tem buscado formas de selecionar o tratamento mais adequado a cada paciente. Em poucas áreas a tarefa é mais essencial que na Oncologia, onde o médico dispõe de terapias altamente tóxicas para tratar uma doença igualmente severa. Dessa forma, sempre se buscaram biomarcadores que pudessem identificar quais subgrupos de pacientes oncológicos poderiam melhor responder a quais terapias, individualizando o seu cuidado (Mehta et al. 2010).

A descoberta e estudo das moléculas PD-1 e CTLA-4 na década de 90, pelo Dr. Honjo e Dr. Allison (Ishida et al. 1992; Leach et al. 1996) respectivamente, culminou na inauguração de uma nova era no tratamento do câncer. Os bloqueadores de correceptores imunes (“bloqueadores de *checkpoint*”), ao bloquearem as vias inibitórias CTLA-4 ou PD-1/PD-L1, permitem a ativação eficaz dos linfócitos T no microambiente tumoral e a subsequente destruição das células tumorais através da citotoxicidade mediada pelos linfócitos T. Em 2014, o ipilimumabe, um anticorpo contra CTLA-4, foi a primeira dessas drogas aprovadas para tratamento de melanoma metastático, com base em resultados de um estudo fase 3 demonstrando aumento da sobrevida nesses pacientes (Hodi et al. 2010). Ainda em 2014, dois diferentes anticorpos contra PD-1 foram também aprovados, o pembrolizumabe e o nivolumabe. Ao contrário da quimioterapia tradicional, que interfere principalmente em células que se multiplicam rapidamente, e das terapias-alvo, que afetam as vias celulares que regulam o crescimento e a invasão das células tumorais; a imunoterapia age ao bloquear mecanismos que as células tumorais utilizam para se evadirem da vigilância do sistema imune do paciente. Uma vez que esses mecanismos de inibição usados pelo tumor são bloqueados, o sistema imune pode novamente reconhecer a célula tumoral como uma célula não-habitual que deve ser eliminada e desencadear uma cascata de eventos que levem à sua destruição (Carter et al. 2018). Entretanto, nem todos os pacientes elegíveis respondem à imunoterapia, e muitos deles desenvolvem resistência após resposta inicial. É neste contexto da busca de biomarcadores de resposta à imunoterapia (Wang et al. 2022) que nosso estudo se insere.

Hoje, após quase 10 anos desde a aprovação do ipilimumabe para tratamento de melanoma metastático, vários outros bloqueadores de checkpoint foram aprovados e atualmente 8 diferentes anticorpos são aprovados para 18 tipos tumorais (Lee et al. 2022). Inclusive, em 2017, o pembrolizumabe, foi o primeiro medicamento aprovado pelo FDA para uso em neoplasias com mutações do sistema de reparo do DNA ou alta instabilidade genômica de microssatélites independentemente do tipo histológico do câncer (Weis et al. 2021).

A imunoterapia determina padrões não usuais de resposta tumoral. Nos testes farmacológicos iniciais, observou-se que uma parte dos pacientes apresentavam aumento tumoral no início do tratamento e apenas tardiamente exibiam sinais de resposta significativa e sustentada. Esse padrão foi denominado pseudoprogressão (Chiou e Burotto 2015). Objetivando melhor avaliar a resposta tumoral nestes pacientes, diversos critérios de avaliação de resposta foram criados, como o irRC, irRECIST, iRECIST e imRECIST (Seymour et al. 2017). Esses critérios foram criados para melhor capturar os padrões de resposta observados nessa modalidade terapêutica, permitindo uma avaliação mais abrangente dos seus efeitos e oferecendo uma nova ferramenta para a investigação clínica da imunoterapia em pacientes com câncer (Wolchok et al. 2009).

Entretanto, mesmo com o surgimento de novas estratégias de avaliação de resposta à imunoterapia, ainda existem muitos fatores preditivos de resposta, mecanismos de resistência e mecanismos de ação secundários que desconhecemos, visto que até 70% dos pacientes continua a responder ao tratamento mesmo após sua suspensão (Larkin et al. 2015).

Além disso, a imunoterapia é uma terapia de alto custo (Tran e Zafar 2018) e, embora possa levar a respostas extremamente duradouras e sustentadas em alguns pacientes e até mesmo cura de neoplasias previamente incuráveis, a proporção de pacientes que apresentam resposta objetiva ainda é menor que naqueles tratados com quimioterapia (Haslam e Prasad 2019). Adicionalmente, embora seu perfil de toxicidade costuma ser mais tolerável que o da quimioterapia, as reações adversas podem ser graves, inclusive levando a óbito caso não sejam prontamente identificadas e tratadas (Kennedy e Salama 2020).

Dessa forma, existe uma necessidade clínica não atendida de biomarcadores e fatores preditivos de resposta que possam selecionar os pacientes que têm maior chance de se beneficiar da imunoterapia, e minimizar seu uso fútil e os riscos a ela associados em pacientes

com menor chance de resposta. Como a imunoterapia se baseia fundamentalmente em restaurar a função imune que permite que nossas células imunes inatas e adaptativas reconheçam o tumor como um tecido anômalo que deve ser combatido, é natural que se investigue o papel dos órgãos imunes primários (medula óssea e timo) ou secundários (linfonodos e baço) na resposta à imunoterapia.

Em relação aos órgãos imunes primários, o estudo da medula óssea em pacientes oncológicos é relevante e um tópico de exploração ativa (Ollivier 2006). Entretanto, seu estudo apresenta desafios dada a distribuição heterogênea da medula óssea no esqueleto e o limitado papel da tomografia computadorizada na sua avaliação, que geralmente é feita com sequências avançadas de ressonância magnética, o que limita sua ampla utilização (Hwang e Panicek 2007). Como nosso objetivo era investigar um biomarcador de imagem que pudesse ser extraído de exames de rotina em pacientes com câncer, o timo tornou-se o órgão imune primário mais interessante para investigação, e seu papel como maestro central na tolerância ou reatividade a antígenos próprios ou de células tumorais anormais é investigado desde ao menos a década de 1960 (Bluestone e Anderson 2020).

Mudanças no volume tímico em consequência do uso de quimioterapia são conhecidas desde a década de 1980, com atrofia durante a terapia citotóxica e regeneração após (Choyke et al. 1987). Na fase de recuperação após um estresse sistêmico, o timo pode inclusive aumentar acima do seu volume pré-estresse, fenômeno conhecido como hiperplasia rebote (Nishino et al. 2006). Alguns estudos em paciente oncológicos tratados com quimioterapia sugerem que essa hiperplasia rebote está associada a bom prognóstico (Cohen et al. 1980; Kissin et al. 1987). No melhor do nosso conhecimento, não havia estudos semelhantes relacionando variações do volume tímico no contexto da imunoterapia e avaliando se havia associação com o prognóstico clínico, conforme objetivamos realizar nesse estudo.

Em relação aos órgãos imunes secundários, o estudo dos linfonodos em pacientes com câncer também é fundamental. Porém não foi objeto de estudo do nosso projeto pois sua distribuição por todo o corpo humano, com tamanhos e morfologias variados conforme a localização regional, e sua função primariamente na regulação imune local (Bronte e Pittet 2013) os tornam objeto de estudo mais útil na avaliação do estadiamento loco regional

oncológico e acometimento neoplásico secundário por disseminação linfática, sendo menos interessante o seu estudo no contexto da resposta imune sistêmica.

Optamos então por direcionar a parte da nossa pesquisa que estuda o sistema imune secundário à avaliação do maior órgão linfoide secundário, o baço. Seu papel essencial na imunidade sistêmica ao câncer é fartamente reconhecido (Ugel et al. 2012; Levy et al. 2015), além do órgão ser um reservatório imune não só dos linfócitos, mas também de células do sistema inato que são direcionadas ao microambiente tumoral (Cortez-Retamozo et al. 2012). Em estudos animais, evidenciou-se que a composição das células imunes presentes no baço altera-se significativamente após administração de bloqueadores de PD-L1 (Markel et al. 2018). Em seres humanos, estudos utilizando PET/CT mostraram alteração na atividade metabólica com o uso da imunoterapia (Schwenck et al. 2020). Um estudo de Wong e colegas (Wong et al. 2020) associou alta atividade metabólica pré-tratamento com pior prognóstico em pacientes com melanoma tratados com um bloqueador de CTLA-4. Assim como no caso no timo, a variação do volume esplênico já foi estudada no contexto da quimioterapia (Wen et al. 2015) e estudos animais sugeriram aumento do volume esplênico com uso de imunoterapia (Schwenck et al. 2020).

1.1 JUSTIFICATIVA

Um biomarcador de resposta oncológica de ampla utilização deve ser preferencialmente barato, não invasivo, altamente disponível e reprodutível. Os métodos de imagem poderiam desempenhar esse papel, visto que já são rotineiramente utilizados na avaliação de paciente oncológicos, não são invasivos, possuem riscos aceitáveis (nominalmente a exposição à radiação e possíveis reações adversas ao contraste) e custos razoáveis.

Vários fatores preditivos de resposta a diversas quimioterapias são conhecidos e estudados há mais de 70 anos. Já em relação à imunoterapia, além do tipo de neoplasia, existem poucos fatores preditivos universalmente reconhecidos. Aqueles já existentes, como carga mutacional (Chan et al. 2019) e quantificação de PD-L1 por imuno-histoquímica (Davis e

Patel 2019), dependem ambos de biópsias invasivas para coleta das amostras, e apresentam suas próprias limitações. Até mesmo a presença de alta instabilidade microssatélite, um dos fatores preditivos de resposta à bloqueadores de *checkpoint* com melhor performance, está associado a uma taxa de resposta objetiva de apenas cerca de 40% (a depender do tipo tumoral), estando longe de garantir a efetividade do tratamento nessa população de pacientes oncológicos(Zhao et al. 2019).

Em relação ao método de imagem a ser analisado, nosso objetivo primário era identificar um biomarcador de imagem de fácil implementação universal. O método mais bem posicionado nesse quesito, pela sua ampla disponibilidade, aceitação e reprodutibilidade foi a tomografia computadorizada e, em menor grau, a ressonância magnética. O PET/CT apresenta limitações de custo, disponibilidade e reprodutibilidade, que limitam sua adoção difusa. Tanto a mensuração do timo como do baço poderia ser facilmente realizada em qualquer uma dessas modalidades.

Finalmente, o A.C.Camargo Cancer Center encontrava-se numa posição ideal para o desenvolvimento desse estudo, sendo um dos centros brasileiros pioneiros em imunoterapia, com mais de 400 pacientes tratados, e tendo inaugurado um Centro de Imunoterapia com uma equipe multidisciplinar de mais de 70 profissionais para acompanhamento dedicado desses pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a espessura do timo e o volume do baço antes e após o uso de imunoterapia para tratamento oncológico e verificar se as medidas pré-tratamento e/ou a variação se correlacionavam com desfechos clínicos de resposta oncológica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Se a hipótese principal se mostrasse verdadeira (i.e., havia diferenças entre bons versus maus respondedores nas medidas pré-tratamento ou na variação após tratamento), calcularíamos um valor de espessura tímica e volume esplênico para uso clínico para diferenciar os bons respondedores versus maus respondedores à imunoterapia e calcularíamos a sensibilidade, especificidade e acurácia dessas medidas.

No subgrupo de pacientes que foram examinados com PET/CT, quantificar a atividade metabólica do timo e baço em relação ao fígado antes e após o uso de imunoterapia através da medida do SUV (*Standardized Uptake Value*) e verificar se o SUV pré-tratamento e/ou a variação se correlaciona com desfechos clínicos de resposta.

Avaliar se há alta correlação entre medidas unidimensionais do baço e a volumetria esplênica e se o volume esplênico apresenta uma curva de distribuição normal em pacientes oncológicos.

Avaliar se há correlação entre a espessura do timo e volume esplênico em pacientes oncológicos.

3 METODOLOGIA

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo de coorte, com coleta retrospectiva, analítico, observacional, unicêntrico, que foi desenvolvido no Departamento de Imagem com apoio do Departamento de Oncologia Clínica do A.C.Camargo Cancer Center.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center / Fundação Antônio Prudente, sob supervisão da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, e foi iniciado apenas após a aprovação dele (parecer 3.280.881).

Foi solicitada e concedida dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido. Os dados clínicos coletados foram depositados na plataforma REDCap e foram realizadas análises dos exames de imagem dos sujeitos incluídos na pesquisa. Conforme Termo de Anuência assinado pelos pesquisadores, os dados coletados depositados na plataforma REDCap e seu uso em futuras pesquisas da Fundação Antônio Prudente já estão implicitamente autorizados, respeitada a política de proteção de dados da instituição e as normas de ética em pesquisa do Conselho Nacional de Saúde.

Conforme protocolo aprovado pelo Comitê de Ética, na eventualidade de que novos achados de imagem fossem caracterizados durante o estudo, eles seriam avaliados conjuntamente pelos pesquisadores envolvidos e caso fossem julgados de relevância clínica seriam comunicados ao oncologista clínico responsável pelo cuidado do sujeito de pesquisa. Durante toda a duração do nosso projeto, não se observaram tais achados.

3.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Os participantes de pesquisa elegíveis para o estudo foram os pacientes oncológicos adultos submetidos a tratamento com drogas da classe das imunoterapias no A.C.Camargo Cancer Center.

3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Início do uso de drogas imunoterápicas (anticorpos anti-CTLA4, anti-PD1, anti-PD-L1) como terapia única ou em combinação com outros tratamentos entre janeiro de 2019 e maio de 2021).
- Apresentarem ao menos 1 exame de imagem da região torácica e/ou abdominal realizado até 3 meses antes do início da imunoterapia. Os pacientes que não apresentaram exames de ambas as regiões acima ainda assim foram incluídos no estudo e seus dados analisados apenas em relação à métrica aplicável (espessura do timo se exame exclusivo do tórax e volume do baço se exclusivo do abdome).
- Os exames de imagem aceitos para satisfazer o critério de inclusão acima foram: tomografia computadorizada, ressonância magnética ou PET/CT. O uso do contraste venoso não foi obrigatório para inclusão neste estudo.

3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Menores de 18 anos de idade.
- Antecedente de esplenectomia.
- Diagnóstico estabelecido de esplenomegalia devido a hipertensão portal ou cirrose hepática.
- Pacientes com nódulos esplênicos, metástases esplênicas (suspeitas à imagem ou confirmadas por biópsia) ou lesões tímicas e/ou mediastinais anteriores focais.

- Imagens dos exames indisponíveis no PACS (*Picture Archiving and Communication System* – Sistema de comunicação e arquivamento de imagens).
- Exames com qualidade técnica insatisfatória para realização das medidas propostas (por exemplo, artefatos de movimentação respiratória acentuados em um exame de ressonância magnética do abdome que impossibilitavam a medida da volumetria esplênica).
- Foram avaliados no Centro de Referência de Imunoterapia mas não chegaram a iniciar o tratamento por qualquer motivo.
- Evoluíram a óbito em menos de 30 dias após o início da imunoterapia.
- Participantes de pesquisa clínica duplo-cega (portanto, sem informação no prontuário sobre haver recebido imunoterapia ou placebo).
- Perda de seguimento após receber apenas a primeira dose de terapia.

3.6 SELEÇÃO DOS PACIENTES

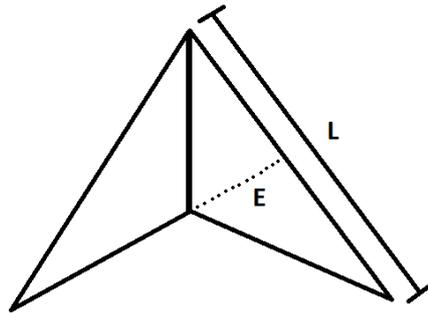
O A.C.Camargo Cancer Center implementou o conceito de “Centro de Referência” para organizar o atendimento clínico dos seus pacientes. A maior parte dos Centros de Referências são organizado por tipo da neoplasia, mas foi também criado um “Centro de Imunoterapia”, em que os pacientes são direcionados devido ao seu tratamento com imunoterapia independente do tipo da neoplasia. O Centro de Imunoterapia possui equipe de mais de 70 colaboradores, incluindo oncologistas clínicos, patologistas, radiologistas, radioterapeutas, pneumologistas, dermatologistas, endocrinologistas, intensivistas e médicos em atendimento de emergência, além de enfermeiros dedicados, responsáveis pelo acompanhamento desses pacientes.

Aproveitando a existência desse Centro, conforme aprovado pelo Comitê de Ética da instituição, solicitamos compartilhamento do número de registro dos pacientes que foram encaminhados para possível tratamento com imunoterapia de 2013 a 2021. Os registros e dados clínicos anonimizados foram depositados em um banco de dados na plataforma institucional REDCap (PID 183). Os prontuários eletrônicos foram acessados via sistema interno H2TC, banco também anonimizado, para aplicação dos critérios de inclusão e exclusão e foram coletados os dados clínicos de interesse.

Após selecionados os participantes elegíveis, foram tabulados os dados clínicos de interesse para o projeto e realizadas as medidas dos órgão-alvo (timo e baço) usando o programa de visualização de imagens clínicas Carestream PACS. Todos os exames de imagem foram avaliados por um médico radiologista júnior (inferior a 5 anos de experiência) e revisados por um médico radiologista sênior (superior a 20 anos de experiência).

3.7 MENSURAÇÃO DO TIMO

O timo habitual tem uma morfologia bilobada, com uma aparência de cabeça de seta em estudos com cortes axiais, como os que foram utilizados em nossa pesquisa. Entre 20 e 40 anos de idade, há substituição gradual do seu parênquima por tecido gorduroso (Moore et al. 1983), substituição essa que pode ser quantificada por ressonância magnética (de Geer et al. 1986). Dada a epidemiologia das neoplasias cujo tratamento aprovado inclui a imunoterapia, esperávamos que a nossa coorte fosse composta majoritariamente por pacientes idosos, com glândulas lipossustituídas. O cálculo preciso do volume tímico nessa população é dificultado (Baron et al. 1982) pela difícil delimitação dos seus limites cranial e caudal. Entretanto, diversos autores mostraram que a medida da espessura (E) do timo correlaciona-se bem com o seu volume total (Francis et al. 1985; de Geer et al. 1986). Além disso, a espessura é uma métrica de mais fácil utilização e padronização e, portanto, com maior potencial para ser utilizada rotineiramente na clínica. Para efeito de consistência, foi mensurada sempre a espessura do lobo esquerdo, que é ligeiramente maior que o direito (Baron et al. 1982), no corte axial em que apresentava a maior área total, escolhida de forma subjetiva pelo examinador, conforme esquematizado abaixo (**Figura 1**).

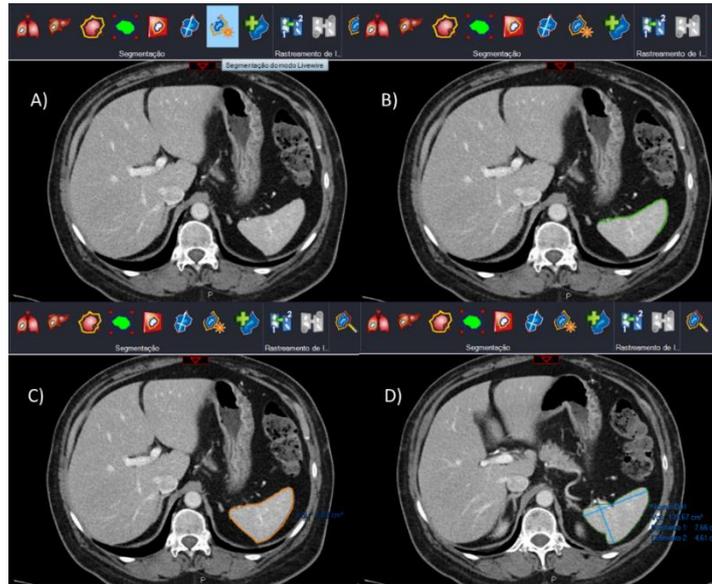


Legenda: L: largura, maior eixo do lobo esquerdo. E: espessura, perpendicular à largura.

Figura 1 - Desenho esquemático do formato piramidal bilobado do timo em corte axial

3.8 MENSURAÇÃO DO BAÇO

Para a volumetria esplênica, usamos o software padrão de visualização de imagens da instituição (Vue PACS v11.0.14.40, Carestream, Rochester, Nova Iorque, Estados Unidos). Esse software possuía uma aplicação para segmentação semiautomática de lesões chamada Livewire (Vue PACS Livewire, Carestream, Rochester, Nova Iorque, Estados Unidos). Essa aplicação usa um algoritmo que delinea e ajusta em tempo real os contornos de uma estrutura com base na diferença de atenuação entre o órgão ou lesão de escolha e suas estruturas adjacentes, levando em conta os contornos da lesão que são desenhados pelo usuário em alguns dos cortes. Após a aceitação pelo usuário dos contornos pré-desenhados, o software automaticamente interpola os limites da estrutura para os outros cortes em que não foi feita a segmentação e define o volume total, a maior medida da estrutura no plano axial e o maior eixo perpendicular a ela no mesmo corte axial. O processo de delineação do baço demorou cerca de 30 segundos por pacientes, tendo sido assim muito mais rápido do que uma segmentação totalmente manual, que pode durar alguns minutos, seria. O processo pode ser visualizado na **Figura 2** e o resultado evidenciado na **Figura 3**.



Legenda: (A) Seleção da ferramenta de segmentação automática Livewire; (B) Contornos da lesão sugeridos em tempo real pelo programa com base em um clique inicial na margem central e um segundo clique na margem lateral; (C) contorno do baço realizado e aceito pelo usuário com 3 cliques no corte demonstrado; (D) cálculo do maior eixo axial e o eixo perpendicular ao mesmo após aceitação pelo usuário da segmentação total.

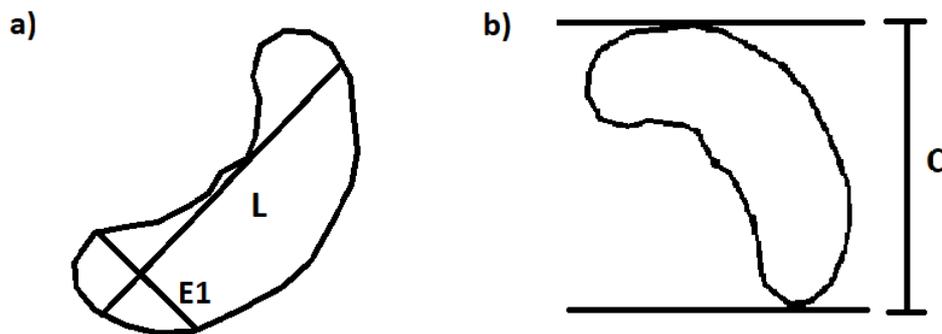
Figura 2 - Demonstração da ferramenta Livewire em exame de tomografia



Legenda: Imagem de tomografia computadorizada nos planos axial, coronal e sagital com o resultado da segmentação semiautomática utilizando a ferramenta Livewire. Os limites da estrutura de interesse (baço) encontram-se em verde e o volume total apresentado ao lado. Neste exemplo, foram necessários cerca de 10 cliques para delimitação do baço e todo o processo durou menos de 30 segundos.

Figura 3 - Resultado em três planos da segmentação esplênica usando a ferramenta Livewire

O maior eixo axial da estrutura e o maior eixo perpendicular a ele calculados pelo software quando aplicados ao baço correspondem, respectivamente, à largura (L) e espessura 1 (E1), definidas por Bezerra e colegas (Bezerra et al. 2005). De acordo com o estudo publicado por Bezerra e colegas, a medida unidimensional que mais se correlacionaria com o volume esplênico total seria o comprimento (C) esplênico, definido como o número de cortes axiais em que o baço pode ser visto no exame multiplicado pela espessura dos cortes. Com o advento dos tomógrafos modernos que adquirem imagens com cortes isovolumétricos e permitem reformações sem perda de resolução, essa medida pode ser mais facilmente realizada usando-se uma reformatação coronal, escolhendo-se o corte onde o baço apresenta o maior tamanho crânio-caudal, e medindo-se uma linha reta nesse mesmo eixo que vai do limite superior até o limite inferior do baço (Figura 4).



Legenda: (A) Desenho esquemático do baço em corte axial com a largura (L) e espessura (E1), calculadas automaticamente pelo software. (B) Desenho esquemático do baço em corte coronal com o comprimento (C) medido desde seu limite superior até seu limite inferior em linha reta crânio-caudal verdadeira.

Figura 4 - Desenho esquemático dos eixos do baço

Com essas medidas, C, L e E1, pudemos calcular o volume esplênico também através das fórmulas tridimensional $[C \times L \times E1 = (2.4074 \times \text{Volume}) - 6.5029]$ ou unidimensional $[C = (0.0126 \times \text{Volume}) + 5.8006]$ proposta pelos autores. Ambas apresentariam alta correlação com o volume calculado manualmente (Bezerra et al. 2005). Um dos objetivos secundários do nosso estudo foi comparar estas medidas unidimensionais e o volume resultante da aplicação fórmulas acima em relação ao volume calculado pelo software de segmentação semiautomática, considerado o padrão-ouro em nosso estudo. .

Outro dos objetivos secundários foi avaliar se a atividade metabólica dos dois órgãos linfoides estudados também variaria com o uso da imunoterapia e se essa variação seria fator preditivo de resposta. Para isso, no subgrupo de pacientes que realizaram PET/CT antes da imunoterapia, quantificamos o SUVmax (Gambhir 2002) do baço e do timo, e comparamos esses valores com o SUVmax do fígado, usado para controle interno do metabolismo do paciente em cada exame. Para cálculo do SUVmax do baço e timo, foram escolhidas manualmente as maiores regiões de interesse volumétricas (VOI) que abrangiam essas estruturas sem incluir estruturas adjacentes. No fígado, foram escolhidos ao menos dois VOIs, um em cada lobo e evitando os vasos hepáticos, e a média usada para definir o SUVmax .

3.9 VARIÁVEIS DO ESTUDO

Os dados coletados dos prontuários eletrônicos e do PACS constam abaixo (**Tabela 1**):

Tabela 1 - Dados coletados dos prontuários eletrônicos e do PACS

Variáveis
RGH (número)
DATA DE NASCIMENTO (data)
IDADE AO INÍCIO DA IMUNOTERAPIA (número)
SEXO (masculino, feminino)
SÍTIO PRIMÁRIO DA NEOPLASIA (melanoma, pulmonar, renal, urotelial, carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, cólon, colo uterino, endométrio, esôfago, fígado, estômago, mama, linfoma, outros)
IMUNOTERÁPICO (nome genérico do medicamento)
DATA INÍCIO IMUNOTERÁPICO (data)
QUIMIOTERAPIA CONCOMITANTE (sim, não)
DESFECHO (progressão, morte, toxicidade, outros)
SE OUTROS, ESPECIFICAR (texto livre)
SE ÓBITO, DATA DO ÓBITO (data)
SE PROGRESSÃO, DATA DA IMAGEM QUE EVIDENCIOU PROGRESSÃO OU DATA DA AVALIAÇÃO CLÍNICA (data)
SE TOXICIDADE, DATA DA SUSPENSÃO DA MEDICAÇÃO (data)
EXAME PRÉ-TRATAMENTO (TC e/ou PET/CT e/ou, RM)
DATA DO EXAME PRÉ-TRATAMENTO (data)
EXAME PÓS-TRATAMENTO (TC e/ou PET/CT e/ou RM)
DATA DO EXAME PÓS-TRATAMENTO (data)

As variáveis calculadas a partir dos dados acima coletados foram:

1. Sobrevida livre de progressão: definida como o tempo decorrido desde o início da imunoterapia até morte, progressão de doença evidenciada por exame de imagem ou suspensão de imunoterapia devido a progressão clínica de acordo com o médico assistente.
2. Espessura tímica: medida conforme descrito no subitem 4.6.
3. Comprimento esplênico: medido conforme descrito no subitem 4.6.
4. Largura esplênica: medida conforme descrito no subitem 4.6.
5. Espessura 1 esplênica: medida conforme descrito no subitem 4.6.
6. Volume esplênico semiautomático: calculado pelo software Vue PACS conforme descrito no subitem 4.6.
7. Volume esplênico medido conforme fórmula unidimensional: $[C = (0.0126 \times \text{Volume}) + 5.8006]$.
8. Volume esplênico medido conforme fórmula tridimensional: $[C \times L \times E1 = (2.4074 \times \text{Volume}) - 6.5029]$.
9. Razão SUVmax timo/SUVmax fígado: relação entre o valor máximo de captação padronizado na área de interesse do timo em relação àquele do fígado. Foi calculado apenas naqueles pacientes que possuíam exames de PET/CT.
10. Razão SUVmax baço/SUVmax fígado: relação entre o valor máximo de captação padronizado na área de interesse do baço em relação àquele do fígado. Foi calculado apenas naqueles pacientes que possuíam exames de PET/CT.

Nota: As variáveis 2 a 10 foram calculadas para os pacientes antes de iniciar a imunoterapia e no primeiro exame realizado após início da imunoterapia.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados clínicos foram armazenados no banco de dados institucional REDCap (número 2668/19) e sua análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism versão 9. Na análise descritiva as variáveis foram apresentadas por meio de frequências absoluta e relativa (variáveis qualitativas) ou por meio das principais medidas resumo (variáveis quantitativas), como média, desvio padrão, mediana, valor mínimo e valor máximo.

Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student (ou não paramétrico de Mann-Whitney, conforme indicação) para comparação de variáveis quantitativas. Para estudo das variáveis qualitativas foram utilizadas tabelas 2 x 2, com avaliação da significância estatística pelo Teste do qui-quadrado de Pearson com correção de Yates ou Teste Exato de Fisher, quando indicado. Para avaliar associação entre duas variáveis contínuas, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados que tiverem probabilidade de erro tipo I menor ou igual a 5% ($p \leq 0.05$)

Para análise da sobrevida foi utilizada a curva de Kaplan-Meier dicotomizada pela mediana das medidas relacionadas ao baço e timo, tanto para toda a coorte como na análise dos 3 subgrupos de sítios mais frequentes de neoplasia da coorte. Para comparação da curva de sobrevida em diferentes grupos foi utilizado o teste de log-rank. Foi também usado o modelo de regressão de Cox para estimativa da razão de risco (HR – *Hazard Ratio*) das variáveis contínuas de medida do baço e do timo, com intervalo de confiança de 95% (CI95%). O nível de significância adotado foi de 5%.

3.11 HIPÓTESES E RESULTADOS ESPERADOS

Em relação ao objetivo primário do estudo, esperava-se que os pacientes com maior volume esplênico e tímico antes do tratamento teriam melhor resposta à imunoterapia (Schwenck et al. 2020), que poderia ser evidenciada pelo aumento nas variáveis de sobrevida coletadas. A justificativa, já explorada anteriormente, seria de que esses pacientes possuiriam

uma maior reserva de células imunes prontas para atacar as células tumorais, uma vez liberado o bloqueio imune causado pela ativação do eixo CTLA-4 ou PD-1/PD-L1. Além disso, esperava-se que a imunoterapia causasse um aumento do volume esplênico e tímico nos primeiros meses após início da terapia, através de hiperplasia linfóide causada pela expansão clonal das células imunes (Choyke et al. 1987; Nishino et al. 2006; Wen et al. 2015). Esperava-se que esse aumento fosse ainda mais pronunciado nos bons respondedores e que pudesse ser usado como um fator preditivo precoce.

Em relação à correlação dos diferentes métodos de medida da volumetria esplênica, esperava-se validar os resultados obtidos por Bezerra e colegas (Bezerra et al. 2005) na nossa coorte de pacientes oncológicos.

Em relação à quantificação da atividade metabólica dos órgãos linfóides no subgrupo de pacientes avaliados por PET/CT, esperava-se que houvesse aumento do metabolismo tímico nos respondedores semelhante ao aumento do metabolismo da medula óssea observado por Schwenck e colegas (Schwenck et al. 2020). Em relação à atividade metabólica esplênica, a literatura é conflitante. Há um estudo mostrando que a atividade metabólica aumentada antes da imunoterapia associa-se com menor sobrevida (Wong et al. 2020), e outro que não encontrou essa relação e ainda encontrou uma tendência não significativa do aumento metabólico após o tratamento estar associado a boa resposta (Schwenck et al. 2020). Nossa hipótese era de que o metabolismo esplênico aumentasse após o tratamento e esse fosse um marcador de boa resposta, independente do metabolismo pré-tratamento.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DESCRITIVA

Foram identificados 406 pacientes encaminhados para consulta no Centro de Referência de Imunoterapia do A.C.Camargo Cancer Center entre janeiro/2019 e maio/2021. Destes, 337 eram potencialmente elegíveis para este estudo conforme os critérios de inclusão e exclusão. Após cadastro das imagens, 188 sujeitos foram incluídos na análise final. O critério de exclusão mais prevalente foi a ausência de exames de imagem antes do início da imunoterapia disponíveis para análise em nosso sistema digital de arquivamento de imagens (PACS). A ausência desses exames se deu em parte devido à indisponibilidade de acesso às imagens realizadas há mais de 2 anos em nossa instituição e em parte pois vários pacientes são encaminhados para tratamento no A.C.Camargo provenientes de outras instituições, já havendo realizado seus estudos de estadiamento nestes outros serviços. Um algoritmo da seleção dos sujeitos está sumarizado abaixo (**Figura 5**):

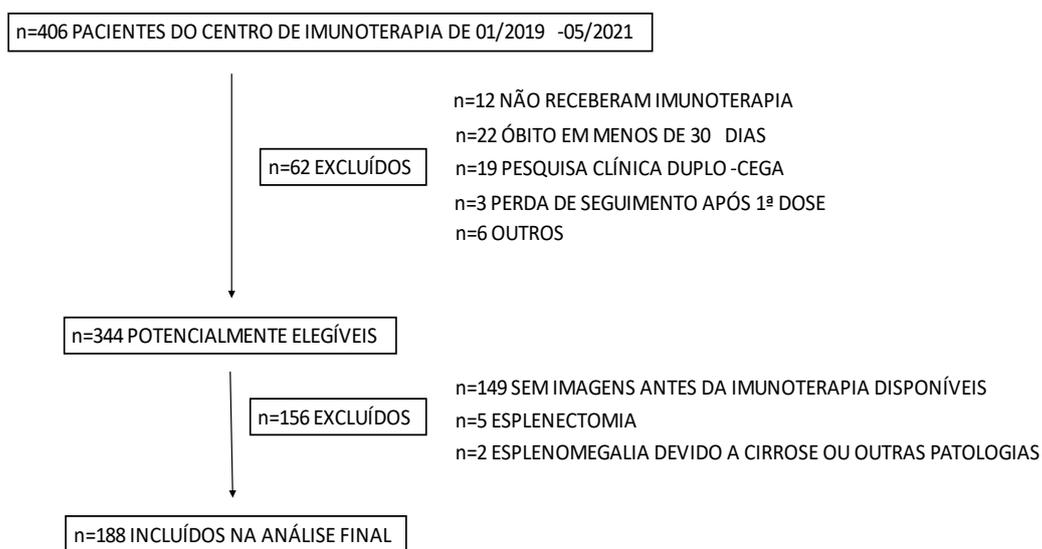


Figura 5 - Algoritmo de seleção dos sujeitos incluídos na pesquisa

Dos 188 sujeitos incluídos, 3 não possuíam exames de seguimento após início da imunoterapia e 14 possuíam exames de abdome, mas não possuíam exames do tórax, o que impediu a mensuração tímica. Nestes casos, seus dados foram incluídos apenas na análise das métricas extraídas do exames antes do tratamento e nas métricas esplênicas, respectivamente. No total foram analisados 205 exames de tomografia de abdome, 152 exames de PET/CT e 16 exames de ressonância magnética. As características de base e dados clínicos dos sujeitos incluídos constam na tabela abaixo (**Tabela 2**):

Tabela 2 - Dados clínicos dos sujeitos incluídos

Dados descritivos (n=188)	
Idade (anos; min-máx.)	64; 25-92
Gênero (M:F)	1,65:1
Tipo da neoplasia	
Melanoma	50 (27%)
Pulmonar	41 (22%)
CEC Cabeça e pescoço	21 (11%)
Renal	15 (8%)
Urotelial	9 (5%)
Endométrio	7 (4%)
Estômago	6 (3%)
Esôfago e transição esofagogástrica	5 (3%)
Mama	5 (3%)
Próstata	5 (3%)
Outros subtipos (n<5/subtipo)	24 (13%)
Imunoterápico utilizado	
Atezolizumabe	18 (10%)
Avelumabe	3 (2%)
Cemiplimabe	3 (2%)
Durvalumabe	3 (2%)
Ipilimumabe+nivolumabe	35 (19%)
Nivolumabe	43 (23%)
Pembrolizumabe	83 (44%)
Quimioterapia ou terapia-alvo em conjunto	
Sim	123 (65%)
Não	65 (35%)

Em relação à data de realização dos exames antes do início do tratamento, que não foi padronizada devido ao caráter retrospectivo do estudo, a mediana foi de 22 dias antes do início da imunoterapia, detalhado conforme segue: 86% entre 60 dias até a data inicial, 10% exames realizados entre 170 e 61 dias anteriores à imunoterapia e 4% exames realizados até no máximo 15 dias após a primeira dose. Em relação à data do primeiro exame de avaliação de resposta, a mediana foi de 75 dias após o início da imunoterapia, 87% deles em até 120 dias e os 13% restantes de 120 a 345 dias após a primeira dose. O seguimento mediano da coorte foi de 17,9 meses, sendo o seguimento mínimo de 1 mês e máximo de 25,7 meses.

4.2 MEDIDAS TÍMICAS EM PACIENTES SUBMETIDOS A IMUNOTERAPIA

A análise da espessura do lobo esquerdo do timo (referida apenas como espessura tímica) foi feita antes e após o início da imunoterapia. Qualitativamente, observou-se que a escolha do corte axial onde havia a maior área total foi altamente subjetiva. Também verificou-se que o formato triangular do timo idealizado muitas vezes não correspondia à realidade. Portanto, definir o maior eixo do lobo esquerdo e sua espessura foi desafiador e observou-se uma alta variabilidade intra-observador (não quantificada neste estudo). Mesmo observando essas limitações, optou-se por prosseguir a análise das medidas tímicas conforme planejado.

O gráfico Q-Q evidenciou uma distribuição não-normal (não-Gaussiana) dos valores tanto antes como após o início do tratamento de acordo com o teste de D'Agostino & Pearson ($P < 0.001$ e $P = 0.001$, respectivamente, $\alpha = 0.05$), conforme abaixo (**Figura 6**).

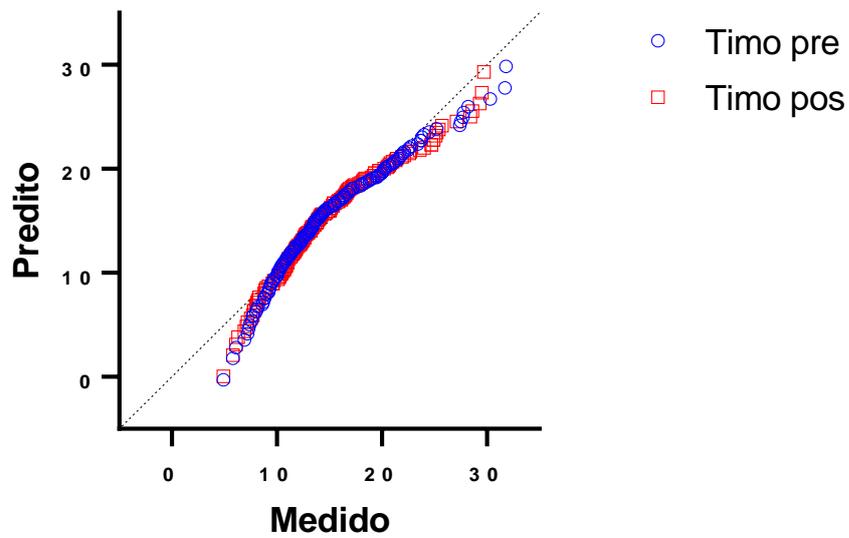


Figura 6 - Gráfico de probabilidades para análise de normalidade dos valores tímicos encontrados

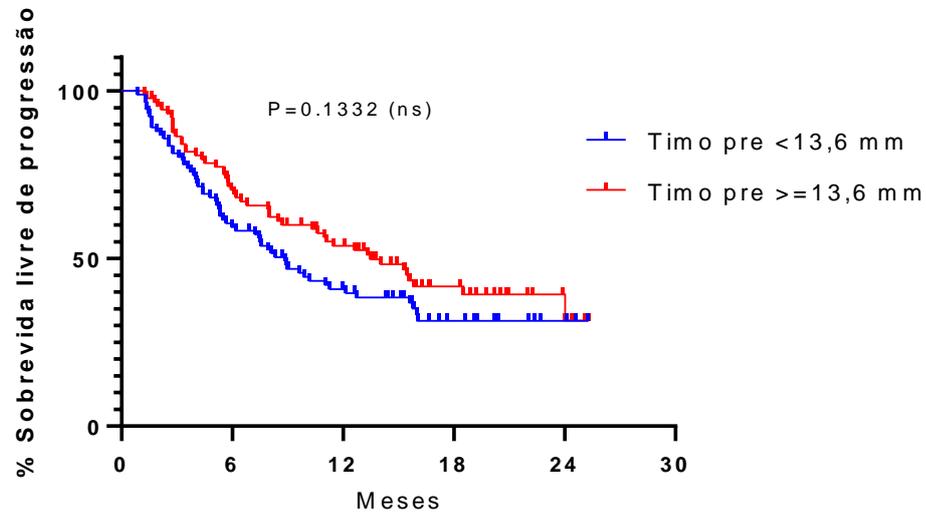
A estatística descritiva das medidas tímicas pode ser encontrada abaixo.

Tabela 3. Estatística descritiva das medidas tímicas

	Espessura tímica pré-tratamento (mm)	Espessura tímica pós-tratamento (mm)	Diferença pós menos pré- tratamento (mm)
Mínimo	4,900	4,900	-6,900
Percentil 25%	10,90	11,00	-1,800
Mediana	13,60	13,70	-0,100
Percentil 75%	18,10	17,23	1,600
Máximo	31,80	29,70	7,800
Média	14,88	14,69	-0,185
Desvio padrão	5,448	5,298	2,683
Erro padrão da média	0,4130	0,4016	0,203
IC 95% limite inferior	14,07	13,90	-0,587
IC 95% limite superior	15,70	15,49	0,215

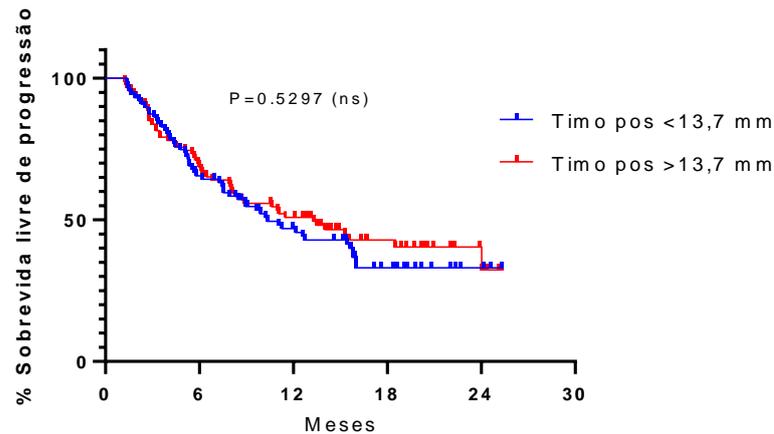
Legenda: mm- milímetros.

nos exames de avaliação de resposta (**Figura 9**). Tampouco houve diferença significativa nos grupos estratificados de acordo com a mudança relativa nas dimensões do timo (**Figura 10**).



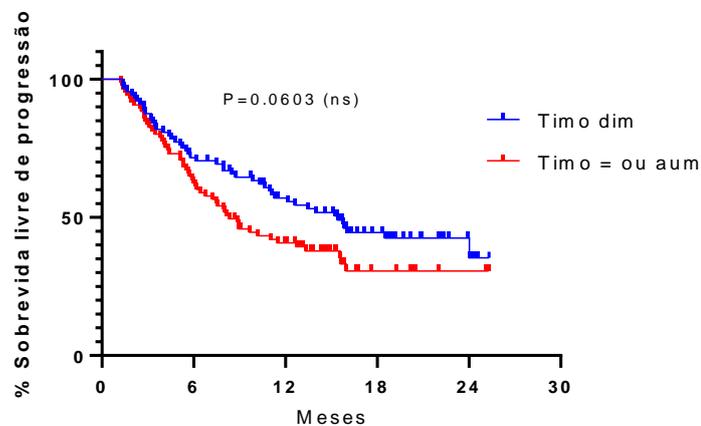
Legenda: ns: não significativo.

Figura 8 - Curvas de sobrevida livre de progressão entre os pacientes com timo medindo menos de 13,6 mm e maiores ou iguais a 13,6 mm antes do início da imunoterapia ($P=0,1332$, teste de Log-rank (Mantel-Cox), sobrevida mediana de 8,9 meses nos sujeitos com timo <13,6 mm e 13,5 meses nos sujeitos com timo $\geq 13,6$ mm)



Legenda: ns: não significativo.

Figura 9 - Curvas de sobrevida livre de progressão entre os pacientes com timo medindo menos de 13,7 mm e maiores que 13,7 mm no primeiro exame de avaliação de resposta após o início da imunoterapia (P=0,5297, teste de Log-rank (Mantel-Cox), sobrevida mediana de 10,3 meses nos sujeitos com timo <13,7 mm e 13,3 meses nos sujeitos com timo >13,7 mm no primeiro exame de avaliação de resposta após imunoterapia)



Legenda: ns: não significativo.

Figura 10 - Curvas de sobrevida livre de progressão entre os pacientes que tiveram diminuição da espessura tímica e aqueles que tiveram estabilidade ou aumento da espessura tímica na análise comparativa entre o exame antes e após o início da imunoterapia (P=0,0603, teste de Log-rank (Mantel-Cox), sobrevida mediana de 15,4 meses nos sujeitos que apresentaram redução do timo e 8,3 meses nos sujeitos cujo timo permaneceu igual ou aumentou)

Adicionalmente, para testar se os extremos da nossa coorte apresentavam comportamento diverso que poderia ter sido mascarado pela análise de dicotomização mediana, foi realizada uma análise não planejada na metodologia inicial (post hoc) com as métricas tímicas pré e pós-tratamento, comparando os pacientes no quartil com menor espessura tímica versus os pacientes no quartil com maior espessura tímica. Essa análise post hoc também não demonstrou diferenças estatisticamente significativas ($P=0.9357$ pré-tratamento e $P=0.0423$, teste de Log-rank (Mantel-Cox)).

O conjunto das análises confirmou a hipótese-nula de que não há diferenças entre esses grupos e, portanto, não foi possível confirmar a hipótese inicial do estudo de que pacientes com timos maiores antes do início do tratamento ou com maior aumento na primeira avaliação de resposta possuíam uma maior reserva de células imunes e consequentemente melhor resposta à imunoterapia.

4.3 MEDIDAS ESPLÊNICAS EM PACIENTES SUBMETIDOS A IMUNOTERAPIA

Conforme descrito na metodologia do projeto, foi usada uma ferramenta de segmentação já presente no software padrão de visualização de imagens da instituição (Vue PACS v11.0.14.40, Carestream, Rochester, Nova Iorque, Estados Unidos) para cálculo do volume esplênico. Não foi necessária obtenção de qualquer software ou aplicação adicional, não sendo necessário tampouco a exportação dos arquivos de imagem ou pós-processamento das imagens adquiridas além do que se encontrava disponível na interface padrão do aplicativo. A aplicação para segmentação semiautomática de lesões já contida no pacote padrão do software comercial chama-se Livewire e funciona através um algoritmo que delinea e ajusta em tempo real os contornos de uma estrutura com base na diferença de atenuação entre o órgão ou lesão de escolha e suas estruturas adjacentes, levando em conta os contornos da lesão que são desenhados pelo usuário em alguns dos cortes.

Qualitativamente, foi observado que a segmentação semiautomática foi mais célere e necessitou de menores correções nos exames de ressonância magnética e nas tomografias com uso de contraste venoso iodado quanto comparado com os exames de tomografia sem

contraste venoso iodado e com os exames de PET/CT, devido ao maior contraste entre o baço e as estruturas adjacentes. No PET/CT, a dose de radiação usada para aquisição da imagem de tomografia é menor que em uma tomografia padrão e por consequência há menor relação sinal-ruído. Foi também observado que a segmentação semiautomática obtinha resultados superiores em pacientes com sobrepeso e obesos, nos quais havia mais tecido adiposo ao redor do baço isolando-o das estruturas adjacentes que possuem atenuação semelhante (vasos, cauda do pâncreas, cúpula diafragmática, musculatura intercostal, rim esquerdo, alças intestinais). De forma contrária, a segmentação semiautomática foi prejudicada e necessitou de mais ajustes em pacientes com menor quantidade de gordura intra-abdominal e nos quais havia intensos artefatos de movimentação respiratória. Entretanto, mesmo nestes casos, o uso da ferramenta para medir o volume do baço ainda se mostrou mais rápido do que a realização da segmentação totalmente manual em cada corte da imagem.

O cálculo da volumetria esplênica foi feito antes e após o início da imunoterapia. O gráfico Q-Q evidenciou uma distribuição não-normal (não-Gaussiana) dos valores tanto antes como após o início do tratamento de acordo com o teste de D'Agostino & Pearson ($P < 0.001$ e $P = 0.001$, respectivamente, $\alpha = 0.05$), conforme abaixo (**Figura 11**).

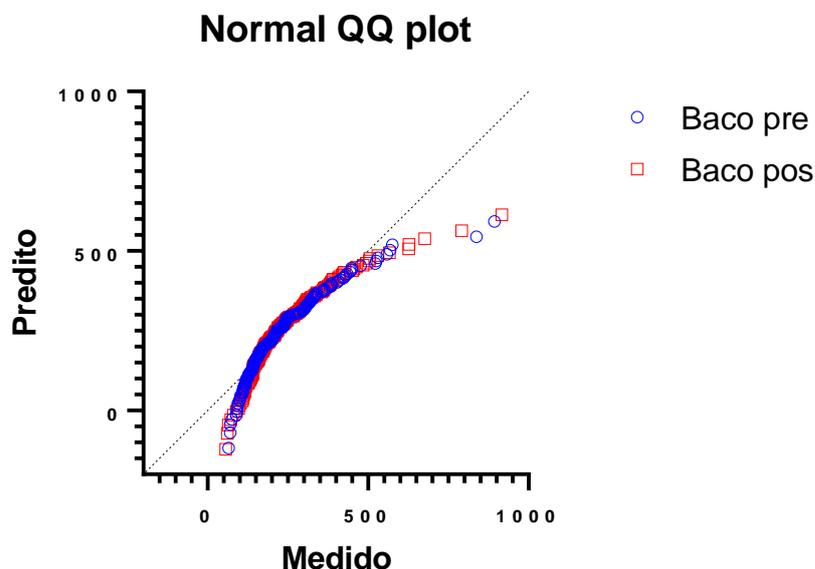
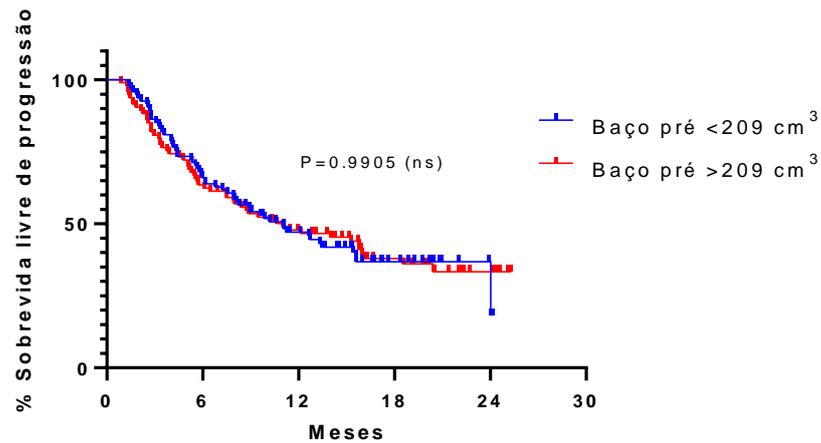


Figura 11 - Gráfico de probabilidades para análise de normalidade dos valores esplênicos

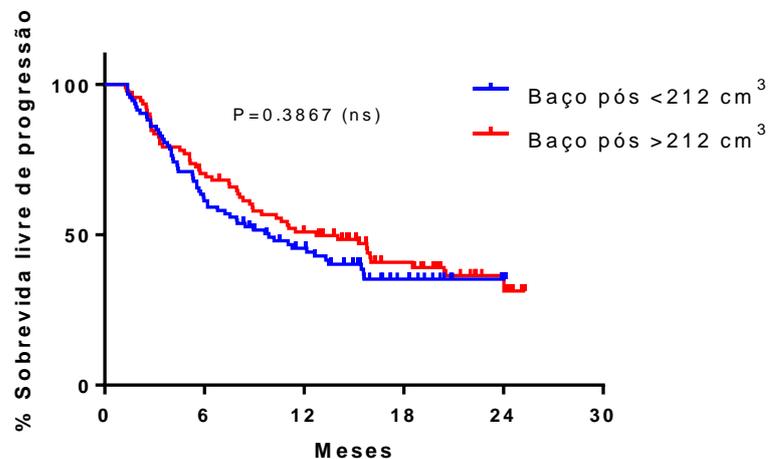
Em seguida, foi realizada uma análise de sobrevida livre de progressão de doença de acordo com o volume esplênico. A população foi dicotomizada pelo valor mediano do volume esplênico, tanto antes como após o tratamento, conforme descrito na metodologia do estudo. Embora a diferença média entre os valores antes e após o início da imunoterapia foi de apenas 8,5 cm³ conforme descrito previamente, houve uma variação individual grande desde diminuir 144,1 cm³ até aumentar 230,6 cm³ entre o exame de base e o primeiro exame de avaliação de resposta. Assim, também foi realizada uma análise de sobrevida dicotomizando a população do estudo entre os pacientes cujo volume esplênico diminuiu e aqueles em que houve estabilidade ou aumento do baço após início da imunoterapia.

De acordo com o teste de log-rank (Mantel-Cox) para comparação das curvas de sobrevida, não houve diferença estatisticamente significativa na sobrevida livre de progressão entre os pacientes com baços menores em relação àqueles com baços maiores, tanto nos exames pré-tratamento (**Figura 13**) como nos exames realizados para a primeira avaliação de resposta (**Figura 14**). Tampouco houve diferença significativa nos grupos estratificados de acordo com a mudança relativa nas dimensões do baço (**Figura 15**).



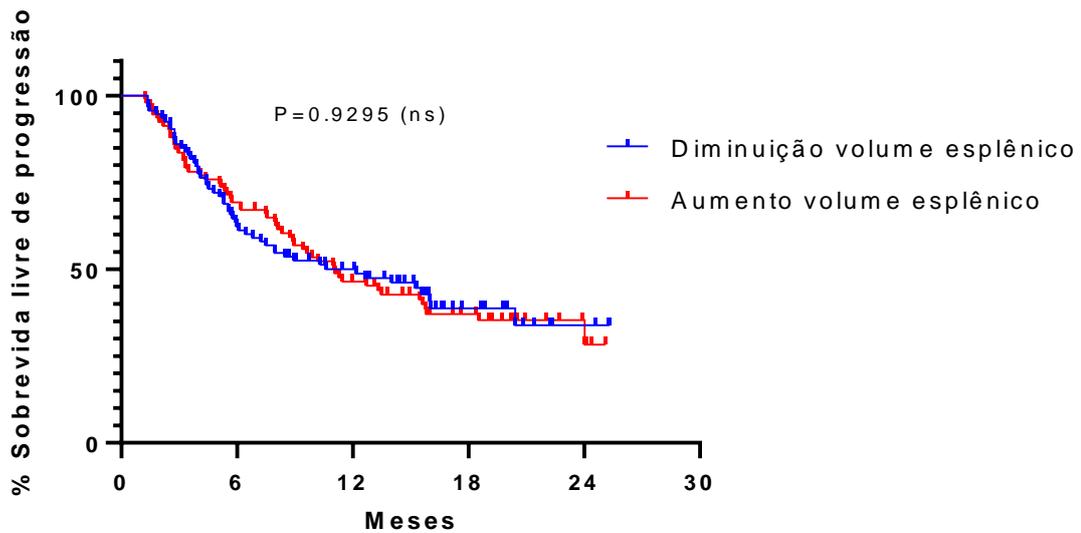
Legenda: ns: não significativo.

Figura 13 - Curvas de sobrevida livre de progressão entre os pacientes com baço medindo menos de 209 cm^3 e maiores ou iguais a 209 cm^3 antes do início da imunoterapia ($P=0,9905$, teste de Log-rank (Mantel-Cox), sobrevida mediana de 11,1 meses nos sujeitos com volume esplênico menor que 209 cm^3 e 11,0 meses nos sujeitos com volume esplênico maior que 209 cm^3)



Legenda: ns: não significativo.

Figura 14 - Curvas de sobrevida livre de progressão entre os pacientes com baço medindo menos de 212 cm^3 e maiores ou iguais a 212 cm^3 no primeiro exame de avaliação de resposta após o início da imunoterapia ($P=0,3867$, teste de Log-rank (Mantel-Cox), sobrevida mediana de 9,9 meses nos sujeitos com volume esplênico menor que 212 cm^3 e 12,7 meses nos sujeitos com volume esplênico maior que 212 cm^3)



Legenda: ns: não significativo.

Figura 15 - Curvas de sobrevida livre de progressão entre os pacientes que tiveram diminuição do volume esplênico e aqueles que tiveram aumento do volume esplênico na análise comparativa entre o exame antes e após o início da imunoterapia (P=0,9295, teste de Log-rank (Mantel-Cox), sobrevida mediana de 12,2 meses nos sujeitos com redução do volume esplênico e 11,1 meses nos sujeitos com aumento)

Adicionalmente, para testar se os extremos da nossa coorte apresentavam comportamento diverso que poderia ter sido mascarado pela análise de dicotomização mediana, foi realizada uma análise não planejada na metodologia inicial (post hoc) com as métricas esplênicas pré e pós-tratamento, comparando os pacientes no quartil com menor volume esplênico versus os pacientes no quartil com maior volume esplênico. Essa análise post hoc também não demonstrou diferenças estatisticamente significativas (P=0.7779 pré-tratamento e P=0.6793, teste de Log-rank (Mantel-Cox)).

O conjunto das análises confirmou a hipótese-nula de que não há diferenças entre esses grupos e não foi possível confirmar a hipótese inicial do estudo de que pacientes com baços maiores antes do tratamento ou com maior aumento da primeira avaliação de resposta possuiriam uma maior reserva de células imunes que seriam ativadas pela imunoterapia e consequentemente melhor resposta à imunoterapia.

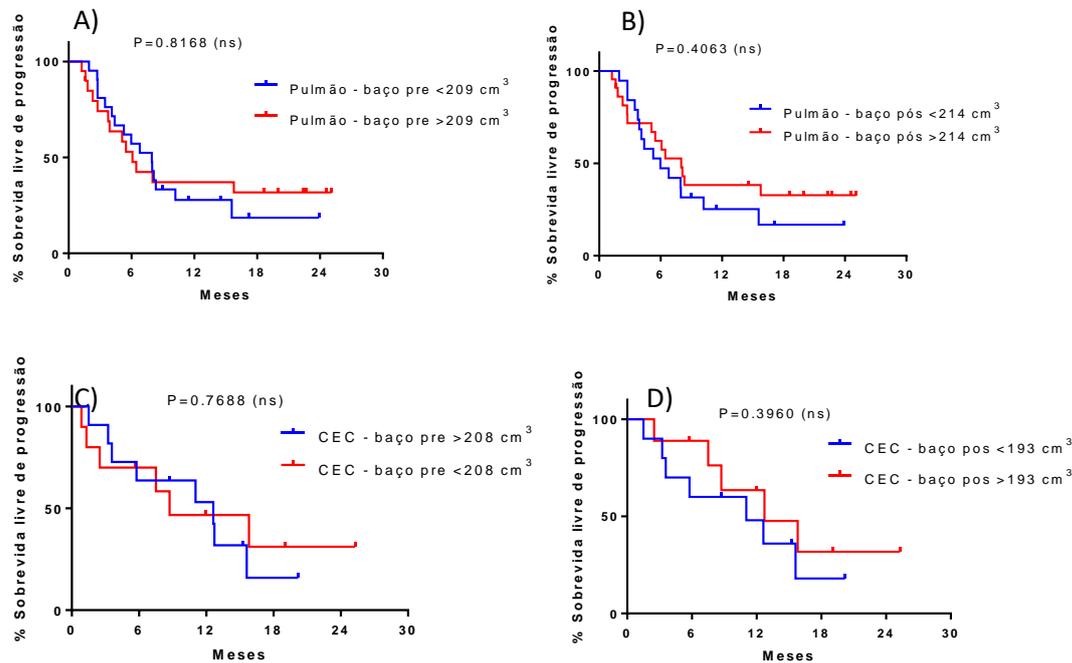
4.4 SUBANÁLISE POR TIPO DE NEOPLASIA

Conforme o planejamento inicial, foi realizada uma subanálise dos dados dos 3 subtipos mais comuns de neoplasia presentes na coorte do estudo. Devido ao achado de baixa reprodutibilidade da mensuração tímica, a subanálise por neoplasia não incluiu as medidas tímicas.

Uma das limitações do estudo era a inclusão de pacientes com neoplasias que respondem de maneira muito diferente à imunoterapia. Era possível que mesmo que não fossem evidenciadas diferenças na sobrevida livre de progressão de acordo com o volume esplênico, a população do nosso estudo era heterogênea e incluía tanto pacientes com neoplasias que sabidamente apresentam melhor resposta à imunoterapia (e.g. melanoma), quanto pacientes para os quais não há evidência forte de eficácia da imunoterapia (e.g. neoplasia da mama e da próstata). Dessa forma, a análise agrupada de todos esses pacientes poderia mascarar diferenças reais devido à heterogeneidade do grupo. Optou-se por limitar a subanálise por tipo de neoplasia apenas às 3 neoplasias mais comuns da coorte por vários motivos: 1) para não incorrer no risco de um resultado estatisticamente significativo apenas devido ao acaso de múltiplas comparações; 2) para que houvesse um número suficiente de sujeitos em cada subgrupo com poder estatístico; 3) objetivando a maior aplicabilidade futura dos possíveis achados nas neoplasias mais comumente tratadas com imunoterapia. Conforme previamente descrito, as neoplasias mais comuns em nossa coorte foram melanoma (n=50), pulmão (n=41) e carcinoma espinocelular (CEC) de cabeça e pescoço (n=21).

A subanálise de sobrevida livre de progressão em cada subtipo tumoral foi realizada de maneira idêntica à análise global da etapa anterior, com os sujeitos divididos em 2 grupos de tamanhos iguais baseados na mediana dos seus valores. Em relação aos pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, não foram evidenciadas diferenças significativas nas curvas de sobrevida com base no volume esplênico antes do tratamento ou no primeiro exame de avaliação de resposta (mediana de sobrevida de 12,6 meses nos sujeitos com baço menores e 8,7 meses com baço maiores pré-tratamento, $P=0,7688$, e mediana de sobrevida de 11,0 meses nos sujeitos com baço menores e 12,7 meses com baço maiores após início do tratamento, $P=0,3960$, testes de Log-rank (Mantel-Cox)).

Em relação aos pacientes com neoplasia pulmonar, também não foram evidenciadas diferenças significativas nas curvas de sobrevida com base no volume esplênico antes do tratamento ou no primeiro exame de avaliação de resposta (mediana de sobrevida de 7,9 meses nos sujeitos com baço menores e 6,1 meses com baço maiores pré-tratamento, $P=0,8168$, e mediana de sobrevida de 6,0 meses nos sujeitos com baço menores e 8,0 meses com baço maiores após início do tratamento, $P=0,4063$, testes de Log-rank (Mantel-Cox)). As curvas de sobrevida podem ser evidenciadas abaixo (**Figura 16**).

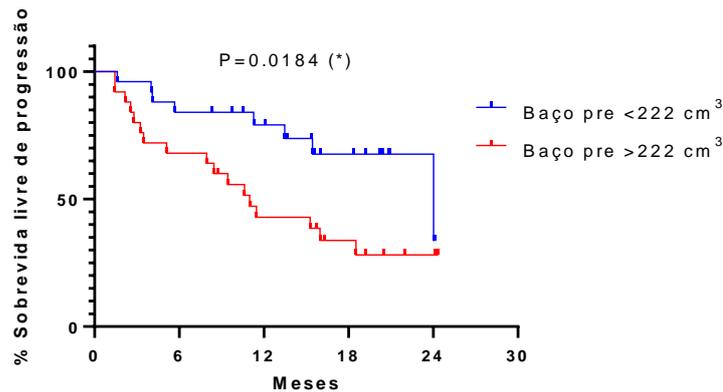


Legenda: (A) pacientes com neoplasia pulmonar e baço medindo menos de 209 cm^3 e mais de 209 cm^3 no exame pré-tratamento resposta (mediana de sobrevida de 7,9 meses nos sujeitos com baço menores e 6,1 meses com baço maiores pré-tratamento, $P=0,8168$, teste de Log-rank (Mantel-Cox)); (B) pacientes com neoplasia pulmonar e baço medindo menos de 214 cm^3 e mais de 214 cm^3 no primeiro exame de avaliação de resposta após o início da imunoterapia (mediana de sobrevida de 6,0 meses nos sujeitos com baço menores e 8,0 meses com baço maiores pré-tratamento, $P=0,4063$, teste de Log-rank (Mantel-Cox)); (C) pacientes com CEC de cabeça e pescoço e baço medindo menos de 208 cm^3 e mais de 208 cm^3 no exame pré-tratamento (mediana de sobrevida de 12,6 meses nos sujeitos com baço menores e 8,7 meses com baço maiores pré-tratamento, $P=0,7688$, teste de Log-rank (Mantel-Cox)); (D) pacientes com CEC de cabeça e pescoço e baço medindo menos de 193 cm^3 e mais de 193 cm^3 no primeiro exame de avaliação de resposta após o início da imunoterapia (mediana de sobrevida de 11,0 meses nos sujeitos com baço menores e 12,7 meses com baço maiores pré-tratamento, $P=0,3960$, teste de Log-rank (Mantel-Cox)). ns: não significativo.

Figura 16 - Curvas de sobrevida livre de progressão nos pacientes com neoplasia pulmonar e carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço

Devido à conhecida menor eficácia da imunoterapia em pacientes com neoplasia pulmonar do tipo pequenas células versus não-pequenas células, também realizamos outra análise post hoc excluindo os 4 pacientes com neoplasia pulmonar do tipo pequenas células da análise, restando apenas 37 sujeitos para avaliação. Novamente, não houve diferença nas curvas de sobrevivência entre o grupo com baços menores e maiores, antes ou após o tratamento ($P=0,6210$ na avaliação antes e $P=0,2666$ na avaliação após início da imunoterapia, teste de Log-rank (Mantel-Cox)).

A avaliação do subgrupo de pacientes com melanoma ($n=50$), o subgrupo de neoplasia mais comum em nossa coorte e o que historicamente melhor responde à imunoterapia, demonstrou diferenças estatisticamente significativas e clinicamente relevantes entre os pacientes com baços menores e maiores incluídos na nossa coorte, conforme pode-se evidenciar abaixo (**Figura 17**). A sobrevivência mediana foi de 24,0 meses nos pacientes com baços menores que 222 cm^3 e de 11,0 meses nos pacientes com baços maiores que 222 cm^3 no exame pré-tratamento ($P=0,0184$, teste de Log-rank (Mantel-Cox)). A sobrevivência baseada no volume esplênico no primeiro exame de avaliação de resposta também se mostrou estatisticamente significativa, sendo a sobrevivência mediana de 11,0 meses nos pacientes com baços maiores que 246 cm^3 e não foi atingida em pacientes com baços menores que 246 cm^3 (teste de log-rank $P=0,0058$)(**Figura 18**). Houve uma ampla similaridade entre os sujeitos de cada subgrupo em ambas as análises, sendo que 23/25 (92%) pacientes com menores baços no exame pré-tratamento também pertenciam ao grupo com menores baços no exame de avaliação de resposta. A maior parte dos pacientes com melanoma (72%) teve um aumento do volume esplênico após o início da imunoterapia, e não houve diferença na sobrevivência entre aqueles cujo baço aumentou ou diminuiu (teste de log-rank $P=0,1598$), salientando-se a limitação desta avaliação devido ao reduzido número de pacientes cujo baço reduziu ($n=14$).



Nota: Uma nova análise dos dados desta figura com maior seguimento foi aceita para publicação em manuscrito escrito pelo autor (Taveira et al, 2023)

Figura 17 - Curvas de sobrevida livre de progressão entre os pacientes com melanoma (n=50) e baço medindo menos de 222 cm^3 e mais de 222 cm^3 no exame antes do início da imunoterapia. A sobrevida mediana foi de 24,0 meses nos pacientes com baços menores que 222 cm^3 e de 11,0 meses nos pacientes com baços maiores que 222 cm^3 no exame pré-tratamento (P=0,0184, teste de Log-rank (Mantel-Cox))

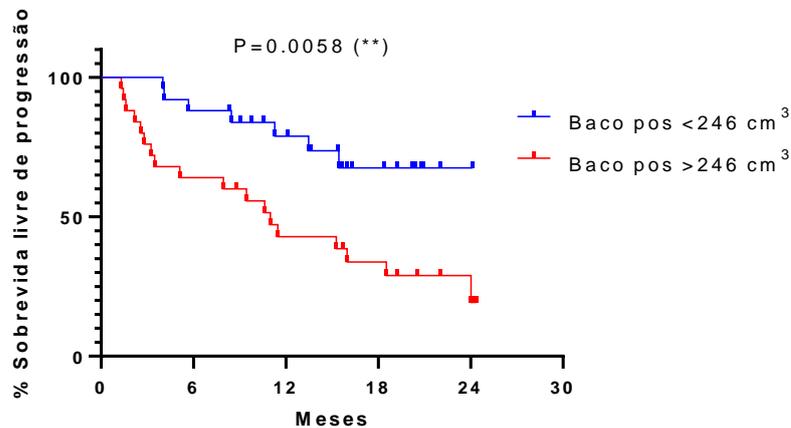


Figura 18 - Curvas de sobrevida livre de progressão entre os pacientes com melanoma (n=50) e baço medindo menos de 246 cm^3 e mais de 246 cm^3 no primeiro exame de avaliação de resposta após o início da imunoterapia. A sobrevida mediana foi de 11,0 meses nos pacientes com baços maiores que 246 cm^3 e não foi atingida nos pacientes com baços menores que 246 cm^3 no exame pré-tratamento (P=0,0058, teste de Log-rank (Mantel-Cox))

Devido aos dados encorajadores relacionando o volume esplênico à sobrevida nos pacientes com melanoma, foi realizada também uma análise de curvas de Característica de Operação do Receptor (curva COR) para avaliar a acurácia do volume esplênico antes e após o início da imunoterapia em diferenciar bons respondedores versus maus respondedores, definidos neste estudo como pacientes com sobrevida maior ou menor que a mediana global dos 50 pacientes (16,0 meses), respectivamente. O volume esplênico mostrou-se estatisticamente significativo na diferenciação dos bons versus maus respondedores, apresentando áreas sob as curvas semelhantes, sendo de 0,6832 nas medidas pré-tratamento ($P=0,0263$) e 0,6848 nas medidas pós-tratamento ($P=0,0250$), conforme evidencia-se abaixo (**Figura 19**). Usando-se os pontos de corte derivados da análise das curvas de sobrevida (baseados na mediana dos valores), calculamos uma sensibilidade de 60% e especificidade de 60% na diferenciação dos bons e maus respondedores usando o corte de 222 cm³ no exame pré-tratamento e uma sensibilidade de 60% e especificidade de 60% na diferenciação dos bons e maus respondedores usando o corte de 246 cm³ no exame de avaliação de resposta.

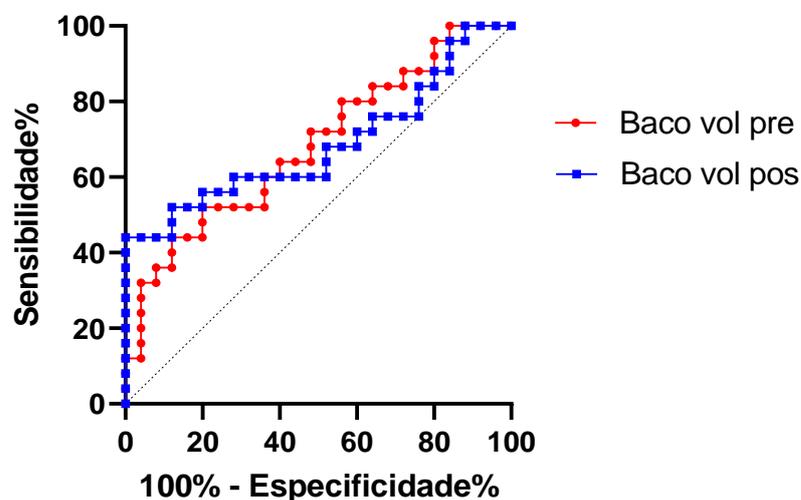


Figura 19 - Curva COR contendo os valores do volume esplênico antes e após o início da imunoterapia para diagnóstico de bons respondedores (sobrevida livre de progressão maior que 16,0 meses) versus maus respondedores (sobrevida livre de progressão menor que 16,0 meses) nos pacientes com melanoma

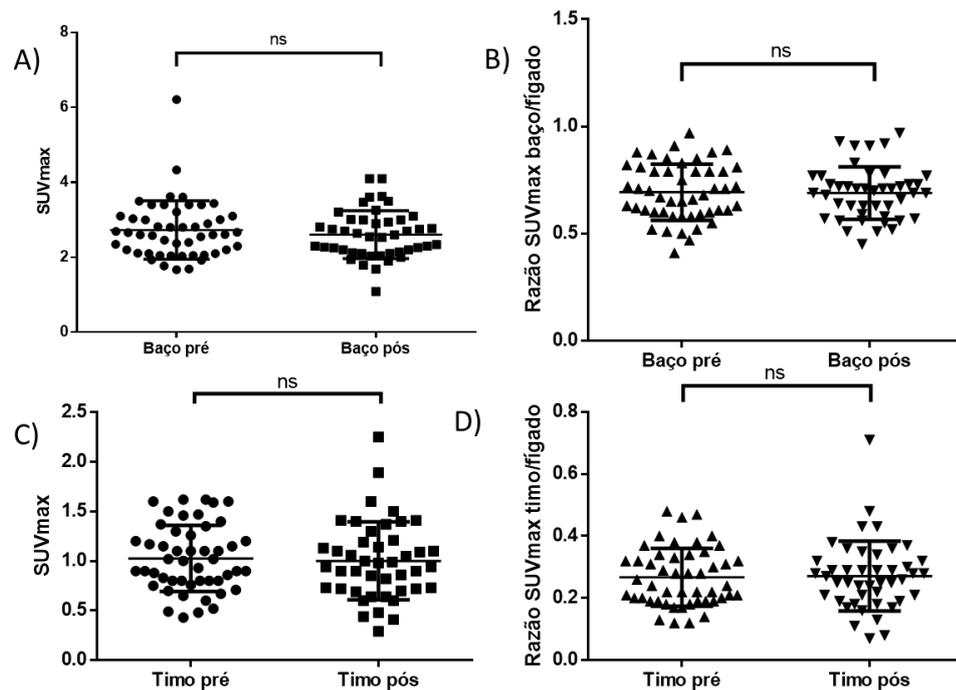
Em seguida, realizamos uma análise de regressão de Cox para estimar qual a razão de risco de progressão associada ao volume esplênico medido antes de iniciar o tratamento. O resultado encontrado foi de uma razão de risco (*hazard ratio*) de 1,005 (IC 95% de 1,002 a 1,008, $P=0.0010$). Dessa forma, sendo verdadeiras todas as suposições do modelo de regressão de Cox (entre outras, a de que o risco associado ao volume esplênico possui uma relação linear com a sobrevida livre de progressão e a de que o risco associado ao volume esplênico é constante ao longo do tempo), chegamos à conclusão que a cada 10 cm³ de aumento do volume esplênico antes do tratamento, associa-se uma chance cerca de 5% maior de progressão (mais precisamente $5,11\%=1,005^{10}$).

4.5 ANÁLISE SECUNDÁRIA DOS EXAMES DE PET/CT

Dos 188 sujeitos incluídos no estudo, 62 foram examinados com PET/CT antes e após o início do tratamento. A análise da captação através do SUVmax foi feita alguns meses após a medida do timo e volume esplênico. Os exames de 13 pacientes tornaram-se indisponíveis para avaliação no sistema de imagens institucional devido ao intervalos entre essas análises e apenas 49 exames de PET/CT foram incluídos.

Conforme descrito na metodologia deste estudo, foi medido o máximo valor de captação padronizado (SUVmax) do timo, baço e do fígado, este último para controle interno de possíveis variações da captação metabólica inerentes ao método.

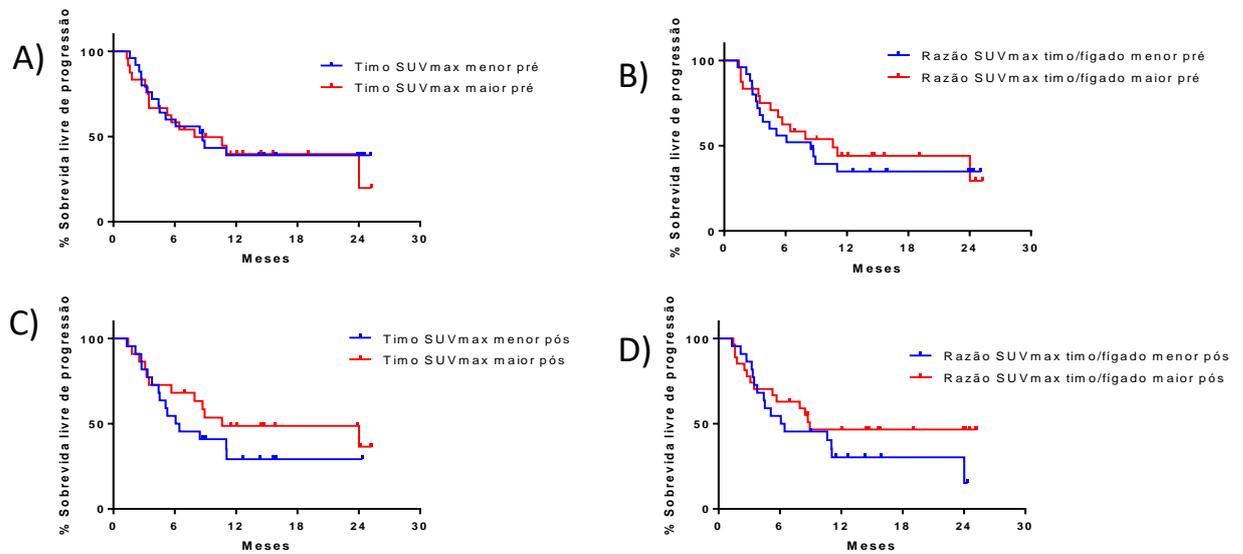
Não foi evidenciada alteração significativa do SUVmax do timo ou do baço após início da imunoterapia, na análise dos valores puros ou controlados usando a razão entre o SUVmax do timo ou baço e o SUVmax hepático para controle interno, conforme abaixo (**Figura 20**).



Legenda: (A) SUVmax esplênico antes e após início do tratamento; (B) SUVmax esplênico/SUVmax hepático antes e após início do tratamento; (C) SUVmax tímico antes e após início do tratamento; (D) SUVmax tímico/SUVmax hepático antes e após início do tratamento ($P=0.4102$, 0.5151 , 0.5397 , 0.5514 , respectivamente; teste de Wilcoxon pareado). ns: não significativo.

Figura 20 - SUVmax do timo e baço antes e após início da imunoterapia

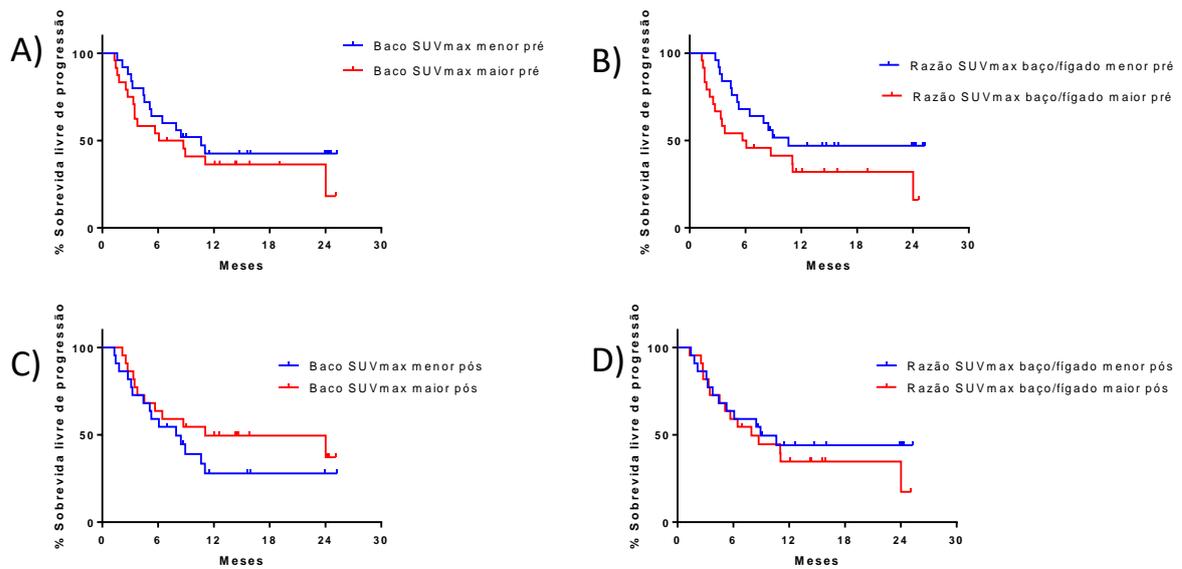
Em seguida, realizamos análises de sobrevida entre dois grupos dicotomizados pela mediana dos valores de SUVmax tímico ou da razão SUVmax tímico/SUVmax fígado, tanto no PET/CT realizado antes como após o início do tratamento. Não evidenciamos diferenças estatisticamente significativas entre os subgrupos, conforme abaixo (**Figura 21**).



Legenda: (A) Dicotomização pelo SUVmax tímico antes do tratamento; (B) Dicotomização pela razão SUVmax tímico/SUVmax hepático antes do tratamento; (C) Dicotomização pelo SUVmax tímico após início do tratamento; (D) Dicotomização pela razão SUVmax tímico/SUVmax hepático após início do tratamento; (P=0.8013, 0.6289, 0.2802, 0.2792, respectivamente; teste de log-rank).

Figura 21 - Curvas de sobrevida livre de progressão conforme o SUVmax tímico antes e no primeiro exame de avaliação de resposta após o início da imunoterapia

Finalmente, realizamos análises de sobrevida entre dois grupos dicotomizados pela mediana dos valores de SUVmax esplênico ou da razão SUVmax esplênico/SUVmax hepático, tanto no PET/CT realizado antes como após o início do tratamento. Não evidenciamos diferenças estatisticamente significativas entre os subgrupos, conforme abaixo (**Figura 22**).



Legenda: (A) Dicotomização pelo SUVmax esplênico antes do tratamento; (B) Dicotomização pela razão SUVmax esplênico/SUVmax hepático antes do tratamento; (C) Dicotomização pelo SUVmax esplênico após início do tratamento; (D) Dicotomização pela razão SUVmax esplênico/SUVmax hepático após início do tratamento; (P=0.3645, 0.0698, 0.2513, 0.5006, respectivamente; teste de log-rank).

Figura 22 - Curvas de sobrevida livre de progressão conforme o SUVmax esplênico antes e no primeiro exame de avaliação de resposta após o início da imunoterapia

4.6 CORRELAÇÃO DA VOLUMETRIA ESPLÊNICA COM MEDIDAS UNIDIMENSIONAIS

Uma das limitações para a ampla introdução da volumetria de órgãos ou lesões na prática clínica é o tempo demandado para segmentação manual dessas estruturas nos exames de imagem. Embora o método utilizado no estudo atual (segmentação semiautomática ou assistida) seja muito mais rápido que a segmentação totalmente manual, ainda assim ocasiona 1 ou 2 minutos de interrupção no fluxo habitual do médico radiologista. Com a crescente demanda por exames de imagem e escassez relativa de novos profissionais, o tempo dedicado a cada exame é cada vez mais escasso e qualquer medida que demore mais que alguns segundos para ser executada tem pouco sucesso de ampla aceitação. Com isso em mente, um dos objetivos secundários do estudo era comparar se a volumetria propriamente dita (padrão-

ouro) poderia ser substituída por fórmulas matemáticas que necessitem apenas de uma ou mais medidas lineares padronizadas do baço. Dessa forma, foi medido no estudo o maior eixo axial do baco e o maior eixo perpendicular a ele que correspondem, respectivamente, à largura (L) e espessura 1 (E1), definidas por Bezerra e colegas (Bezerra et al., 2005). Foi também medida a projeção do comprimento craniocaudal do baço (comprimento – C), a medida que conforme estes autores mais se correlacionava com o volume esplênico total. O volume esplênico foi calculado através das fórmulas tridimensional [$C \times L \times E1 = (2.4074 \times \text{Volume}) - 6.5029$] ou unidimensional [$C = (0.0126 \times \text{Volume}) + 5.8006$] propostas por Bezerra et al., 2005.

Como já havíamos provado uma distribuição não-normal desses valores em nossa coorte, usamos o teste r de Pearson para análise da correlação entre a volumetria semiautomática e o volume calculado pela fórmula tridimensional proposta por Bezerra et al., a volumetria semiautomática e o volume calculado pela fórmula unidimensional usando o comprimento C proposta por Bezerra et al. e cada uma das 3 medidas unidimensionais individualmente. Os dados podem ser evidenciados abaixo (**Tabela 5**).

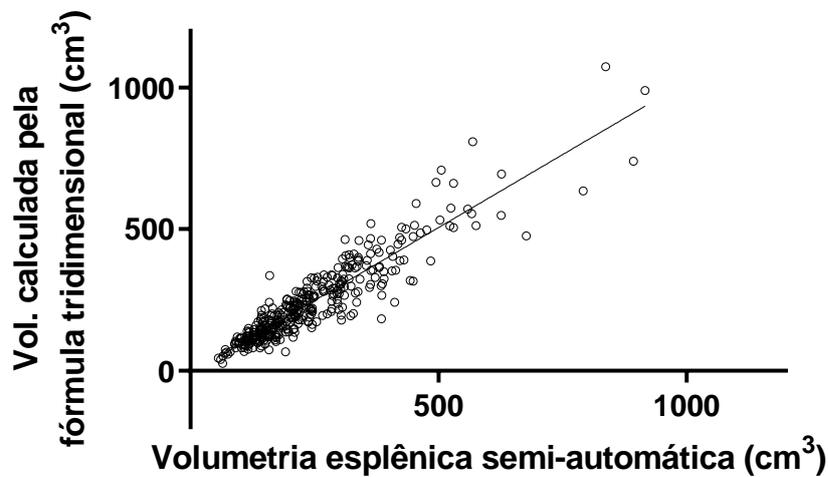
Tabela 5 - Correlação entre a volumetria esplênica semiautomática (Livewire), fórmula usada para cálculo do volume esplênico com 3 medidas, fórmula usada para cálculo do volume esplênico com a medida craniocaudal e medidas esplênicas unidimensionais

	Fórmula tridimensional (C+L+E1)	Fórmula unidimensional (C)	Comprimento C	Largura L	Espessura E1
Pearson r	0,9229	0,7735	0,7735	0,8136	0,6007
IC 95%	0,9063-0,9366	0,7293-0,8114	0,7293-0,8114	0,7762-0,8453	0,5316-0,6619
R ²	0,8517	0,5984	0,5984	0,6619	0,3608
P (2 caudas)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Legenda: C – comprimento, E1 – espessura 1, L – largura.

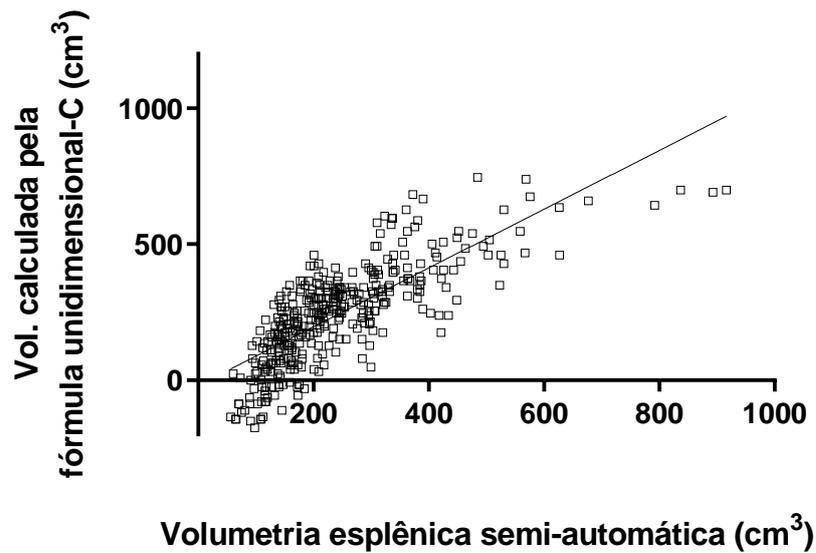
Foram incluídos os dados de 373 volumes esplênicos da nossa coorte, auferidos antes e após o início do tratamento e agrupados conjuntamente para esta porção da pesquisa. Observou-se correlação muito forte ($r > 0,9$) entre o volume esplênico semiautomático

(padrão-ouro) e o volume esplênico calculado utilizando-se a fórmula tridimensional (**Figura 23**); correlação forte ($0,7 < r < 0,9$) entre o volume esplênico semiautomático e o comprimento esplênico (e conseqüentemente o volume calculado a partir do mesmo) (**Figura 24**); correlação forte ($0,7 < r < 0,9$) entre o volume esplênico semiautomático e a largura esplênica (**Figura 25**); correlação moderada ($0,5 < r < 0,7$) entre o volume esplênico semiautomático e a espessura esplênica (**Figura 26**).



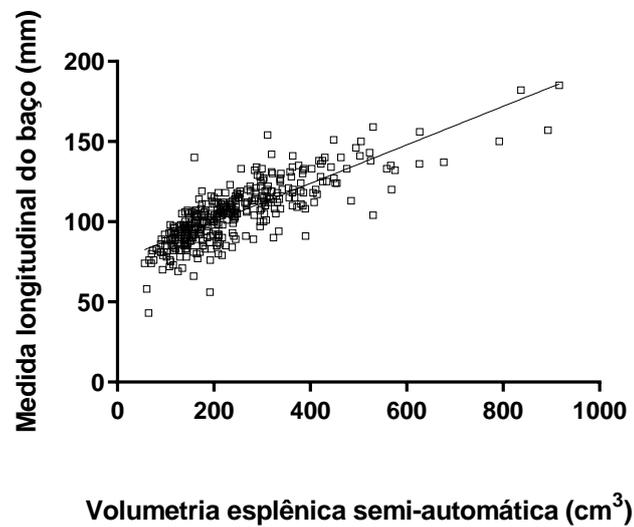
Legenda: Foi também incluído no gráfico a reta representando a análise de regressão linear. Há uma correlação muito forte entre os dois valores (r de Pearson=0,9299, $P < 0,0001$).

Figura 23 - Gráfico XY da volumetria esplênica semiautomática versus valores calculados pela fórmula tridimensional para cada paciente



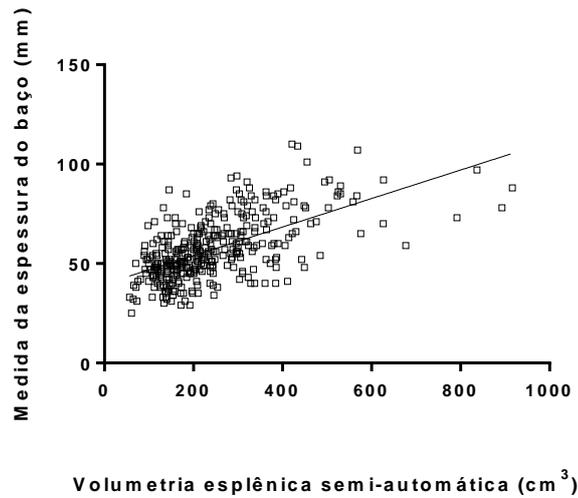
Legenda: Foi também incluído no gráfico a reta representando a análise de regressão linear. Há uma correlação forte entre os dois valores (r de Pearson=0,7735, $P<0,0001$).

Figura 24 - Gráfico XY da volumetria esplênica semiautomática versus valores calculados pela fórmula baseada no comprimento craniocaudal



Legenda: Foi também incluído no gráfico a reta representando a análise de regressão linear. Há uma correlação forte entre os dois valores (r de Pearson=0,8136, $P<0,0001$).

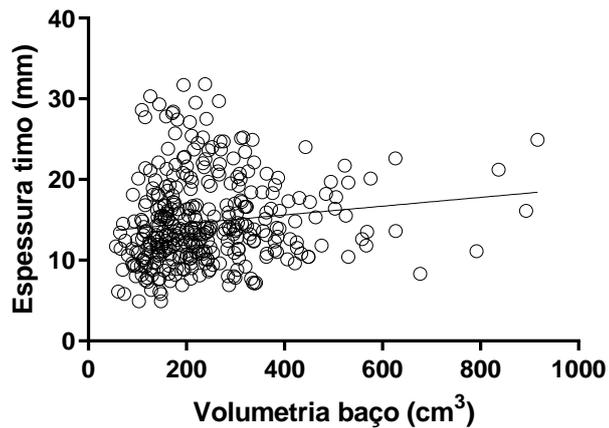
Figura 25 - Gráfico XY da volumetria esplênica semiautomática versus largura L para cada paciente



Legenda: Foi também incluído no gráfico a reta representando a análise de regressão linear. Há uma correlação moderada entre os dois valores (r de Pearson=0,6007, $P<0,0001$).

Figura 26 - Gráfico XY da volumetria esplênica semiautomática versus medida da espessura do baço para cada paciente

Um dos outros objetivos secundários era avaliar se havia correlação entre as medidas do timo e a volumetria esplênica. Conforme abaixo (**Figura 24**), nota-se uma correlação desprezível ($0<r<0,3$) entre a espessura do timo e a volumetria semiautomática do baço (coeficiente de Pearson $r = 0,1909$, IC 95% de 0,0854-0,2922).



Legenda: Foi também incluído no gráfico a reta representando a análise de regressão linear. Há uma correlação desprezível entre os dois valores (r de Pearson=0,1909, $P=0,0003$).

Figura 27 - Gráfico XY da volumetria esplênica semiautomática versus medida da espessura do timo para cada paciente

4.7 DISCUSSÃO

Em relação ao uso do timo como biomarcador por imagem de resposta à imunoterapia, embora não tenhamos encontrado correlação entre as medidas e desfechos clínicos, sugerimos interpretação cautelosa dos nossos resultados. Não fizemos uma análise formal da variação intra- e inter-observador da medida da espessura tímica proposta, mas observamos que foi desafiador seguir o plano originalmente proposto na nossa metodologia. A forma idealizada do timo bilobado relativamente simétrico na maior parte das vezes não se confirmou, sendo difícil escolher qual corte com maior área e medir consistentemente seu maior eixo axial (e por consequência o eixo ortogonal a ele, a espessura usada no nosso estudo). Para futuros estudos que almejem estudar o timo em pacientes adultos através de tomografia ou PET/CT, sugerimos que seja definido um ponto anatômico reprodutível (por exemplo, o nível do ligamento arterioso) e toda a área tímica seja analisado naquele corte, inclusive com mensuração da sua atenuação à tomografia. Também é possível que nosso estudo não tenha capturado a dinâmica da hiperplasia tímica, que pode ocorrer mais tardiamente no decorrer do tratamento. Uma via de investigação futura seria avaliar a composição tímica através da medida da quantidade de gordura versus tecido linfóide no seu parênquima. Isso poderia ser feito através do uso de sequências dentro de fase e fora de fase na ressonância magnética ou mensuração da atenuação média na tomografia computadorizada. A lipossustituição tímica é uma função da idade e o aumento do tecido linfóide remanescente após resolução de estressores sistêmicos como quimioterapia já foi relatado (Nishino et al. 2006) e associado a bom prognóstico (Cohen et al. 1980; Kissin et al. 1987). O uso da ressonância magnética pode ser particularmente atrativo em estudos do timo em pacientes pediátricos, onde se exerce cautela ainda maior no uso de tomografia, devido ao risco relacionado à exposição à radiação.

Uma alternativa para contornar as dificuldades da mensuração tímica, que também pode ser usada para automatizar totalmente a mensuração esplênica, é o uso da inteligência artificial. A aplicação de inteligência artificial para análise de imagens de exames radiológicos é uma área em franca expansão e há inúmeras estratégias para segmentação e análise volumétrica de estruturas macroscópicas como o timo e o baço (Pickhardt et al. 2021;

Pickhardt 2022).

Em relação à volumetria esplênica, evidenciamos que a distribuição do volume esplênico em pacientes oncológicos candidatos à imunoterapia não segue uma distribuição normal, e esse achado provavelmente pode ser extrapolado também para toda a população oncológica e porventura toda a população adulta. Nossos dados sugerem que a imunoterapia leva a um aumento estatisticamente significativo de 8,5 cm³ no volume esplênico (P=0.0118, teste de Wilcoxon pareado), confirmando uma das hipóteses do nosso estudo, embora essa magnitude (inferior a 5% de aumento) seja difícil de ser evidenciada apenas através do exame clínico. Em um modelo primata onde os animais foram submetidos a autópsia após o tratamento com anti-PD-1 e anti-CTLA-4, observou-se que o aumento do volume esplênico se deu devido a um aumento na proliferação dos linfócitos-T. O achado foi caracterizado histopatologicamente por aumento do número de linfócitos-T na polpa vermelha do baço, folículos linfoides maiores e mais larga zona marginal (Ji et al. 2019). O aumento do volume esplênico após início da imunoterapia também já foi evidenciado em humanos, num estudo de 49 pacientes com melanoma (Susok et al. 2021). Semelhante aos achados do estudo de Susok e colegas, também não encontramos relação entre o grau de aumento do volume esplênico e desfechos de sobrevida.

Um dos nossos objetivos principais era evidenciar se o volume esplênico antes do início do tratamento poderia ser usado como biomarcador para identificar pacientes com maior probabilidade de resposta à imunoterapia. A hipótese seria de que pacientes com baços maiores possuíam uma maior reserva de linfócitos prontos para atacar as células tumorais, uma vez que fosse antagonizado o bloqueio causado pela expressão de PD-L1 pelas células tumorais. Nosso estudo não confirmou essa hipótese, e não encontramos diferença na sobrevida livre de progressão entre pacientes com baço maiores e menores. Entretanto, numa nova revisão da literatura após a coleta de dados, encontramos um artigo recentemente publicado por Galland e colegas (Galland et al. 2021) com uma hipótese antagônica à que havíamos formulado no início do nosso projeto. Com base em estudos em pacientes com neoplasia pancreática tratados com quimioterapia (Aarnink et al. 2018) e pacientes com neoplasia colorretal tratados com quimioterapia e bevacizumabe (Niogret et al. 2020), Galland e colegas teorizaram que pacientes com maior volume esplênico antes do tratamento também teriam pior resposta à imunoterapia. A base biológica desta hipótese formulada

pelos autores é que o maior volume esplênico seria um marcador de acúmulo de MDSCs, células supressoras derivadas da linhagem mieloide (do inglês *myeloid-derived suppressor cells*).

As células supressoras derivadas da linhagem mieloide são biologicamente próximas aos neutrófilos e monócitos (e por consequência macrófagos e células dendríticas). Evolutivamente, fazem parte do sistema imune inato que apresenta um papel crítico tanto na proteção dos mamíferos contra patógenos externos quanto por orquestrar a reparação tecidual (Gabrilovich 2017). As MDSCs não estão presentes na circulação em níveis expressivos em humanos saudáveis, mas acumulam-se em pacientes com inflamação crônica e câncer, sendo cooptadas pelas células tumorais para promoção de neoangiogênese tumoral, estabelecimento de metástases em sítios distantes e resistência medicamentosa (Mehta et al. 2021). Existem evidências de que elas limitam a eficácia dos linfócitos T ativados pelos inibidores de *checkpoint* (anti-CTLA-4 e anti-PD-1). Portanto, desenvolver imunoterapias combinadas que também as modulem além de interferir na função linfocitária é um caminho potencial para superar a resistência aos inibidores de *checkpoint* (Gabrilovich 2017).

Galland e colegas estudaram pacientes com neoplasia pulmonar não-pequenas células metastáticas tratados com imunoterapia e evidenciaram que um maior volume esplênico antes do tratamento está associado a pior sobrevida global, mas não acharam diferenças na sobrevida livre de progressão entre estes pacientes, concluindo que o volume esplênico pré-tratamento seria um fator prognóstico, mas não preditivo. Dito isso, o mesmo estudo conclui que o volume esplênico após início do tratamento e um aumento do volume esplênico com o tratamento poderiam ser fatores não só prognósticos como também preditivos (Galland et al. 2021).

Nosso estudo não foi desenhado para análise de sobrevida global devido à heterogeneidade dos tipos de neoplasia incluídas e o tempo de seguimento limitado para termos eventos suficientes (óbitos) com poder amostral robusto. Optamos então por analisar apenas a sobrevida livre de progressão na nossa coorte. Na análise global dos nossos dados, incluindo todas as neoplasias, também não achamos correlação entre o volume esplênico pré-tratamento e sobrevida livre de doença. Ao contrário dos autores, nossos resultados referentes ao volume esplênico após início do tratamento e mudança no volume não se

correlacionaram com sobrevida livre de progressão, nem na análise global, nem na análise apenas de neoplasia pulmonar.

Entretanto, na subanálise por subtipo de neoplasia, evidenciamos que nos sujeitos com melanoma (n=50), um maior volume esplênico antes do início da imunoterapia associou-se a pior sobrevida livre de doença. Esses e outros achados em pacientes com melanoma foram a base do manuscrito aceito para publicação cuja carta de aceite encontra-se anexa nesta tese. Na subanálise dos pacientes com neoplasia pulmonar (n=41) e carcinoma espinocelular (CEC) de cabeça e pescoço (n=21), os resultados foram semelhantes à análise global. Em outras palavras, confirmaram a hipótese-nula de que não há diferenças entre os grupos. É possível que o limitado número de sujeitos e eventos em cada subgrupo tenha reduzido o poder da análise em detectar diferenças significativas.

Há várias interpretações que podem explicar essa desconexão entre os resultados da subanálise dos paciente com melanoma e os resultados globais que encontramos. Algumas das possíveis explicações são limitações do nosso próprio estudo que serão pormenorizadas abaixo. Notadamente, a inclusão de uma coorte heterogênea de pacientes com diferentes tipos de neoplasia em cuja eficácia da imunoterapia varia consideravelmente pode ter ocultado achados que são biologicamente relevantes em apenas alguns tipos histológicos. É razoável supor que os mecanismos de resistência à imunoterapia não são todos globalmente compartilhados independente do sítio de origem tumoral e, portanto, em alguns tipos tumorais o papel do acúmulo de MDSCs no baço pode ser mais ou menos relevante em relação a outros fatores de resistência à imunoterapia, como o microambiente tumoral, por exemplo.

Especificamente em relação à neoplasia pulmonar, o fato de que não confirmamos a hipótese de Galland e colegas deve ser interpretado com cautela. Primeiramente, nossa coorte incluiu apenas 41 sujeitos (versus 276 no estudo deles), podendo nossa coorte simplesmente não ter poder para detectar diferenças na sobrevida livre de progressão com esse número de sujeitos. Outra importante diferença é que o estudo deles inclui apenas pacientes metastáticos e excluiu pacientes tratados em caráter adjuvante, enquanto o nosso estudo incluiu também pacientes sem metástases em tratamento adjuvante. Há diferenças também no subtipo de neoplasia pulmonar: enquanto o estudo de Galland e colegas incluiu exclusivamente tumores de pulmão não-pequenas células, nosso estudo não fez essa restrição e cerca de 10% dos nossos pacientes (4/41) apresentavam neoplasia de pequenas células, que

possui sabidamente menor resposta à imunoterapia. Além disso, apenas cerca de 5% (2/41) dos sujeitos em nosso estudo apresentavam neoplasia escamosa enquanto 30% da coorte deles era composta por esse subtipo de neoplasia pulmonar. Por fim, conforme pormenorizado adiante em relação às limitações gerais do nosso estudo, nosso ponto de corte na análise do volume esplênico foi de 209 cm³ e o deles de 194 cm³, salientando-se que ambos os valores de corte são de certa forma arbitrários.

Um dos objetivos secundários do nosso estudo era avaliar se havia correlação entre a medida da espessura tímica e o volume esplênico. Foi encontrada correlação desprezível entre a espessura tímica e o volume esplênico (coeficiente de Pearson $r = 0,1909$, IC 95% de 0,0854-0,2922). Tendo em vista os diferentes papéis que esses órgãos desempenham no sistema imune, o timo sendo um órgão imune primário - onde há produção e seleção precoce de progenitores linfoides - e o baço sendo um órgão imune secundário - onde residem reservas de linfócitos maduros responsáveis por iniciar a resposta imune - não é surpreendente que não tenha sido encontrada essa correlação.

Outro objetivo secundário era avaliar se medidas esplênicas unidimensionais podiam substituir a volumetria esplênica propriamente dita. Uma das limitações para a ampla introdução da volumetria de órgãos ou lesões na prática clínica é o tempo demandado para segmentação manual dessas estruturas nos exames de imagem. Se fosse possível substituir a volumetria esplênica por uma ou poucas medidas unidimensionais esplênicas, a chance de adoção do biomarcador proposto seria muito maior. Evidenciamos correlação muito forte (coeficiente de Pearson $r = 0,9229$, IC 95% de 0,9063-0,9366) entre a volumetria esplênica e a fórmula proposta por Bezerra e colegas (Bezerra et al. 2005). Entretanto, essa fórmula demanda 3 medidas diferentes e o uso de uma fórmula que não é facilmente memorizável: $C \times L \times E1 = (2.4074 \times \text{Volume}) - 6.5029$. Levando-se em consideração que a variação média do volume esplênico antes e após o início do tratamento foi de apenas 8,5 cm³, acreditamos ser necessária a volumetria esplênica propriamente dita para investigação de fenômenos relacionados ao volume esplênico em estudos científicos. Das medidas unidimensionais esplênicas, a que melhor se correlacionou com o volume esplênico em nossa coorte foi a largura - definida como a maior linha reta que pode ser desenhada dentro do baço em cortes axiais. Esse dado é diferente do apresentado por Bezerra e colegas, onde houve maior correlação entre o volume e o comprimento esplênico - distância entre o limite superior e

inferior esplênico no plano coronal. Assim, para aplicação no dia a dia, onde deve-se achar um equilíbrio entre a medida mais cientificamente fiel e a mais célere de ser realizada, recomendamos a medida da largura esplênica ao invés do comprimento, dado que a medida da largura é não só mais comum como também realizada no plano axial, o plano rotineiramente utilizado para leitura dos exames. De certa forma, com o avanço da inteligência artificial e a facilidade cada vez maior na segmentação de estruturas anatômicas abdominais (Pickhardt et al. 2021; Pickhardt 2022), a discussão da melhor forma de medir o baço pode se tornar irrelevante em um futuro próximo. Ao mesmo tempo, a facilidade com que o volume esplênico e outras métricas podem ser calculadas pela inteligência artificial abre novas frentes de exploração que talvez demandassem um trabalho intensivo de mensuração que poderia inviabilizar este tipo de estudo. Um exemplo recente é o uso de inteligência artificial solidificando a relação entre o uso de trastuzumabe emtansina e o desenvolvimento de hipertensão portal não-cirrótica através da mensuração automática do volume esplênico em uma coorte de pacientes com neoplasia da mama (Choi et al. 2022).

Em relação ao nosso objetivo secundário de avaliar se a atividade metabólica tímica e esplênica medida através do PET/CT poderia discriminar os bons e maus respondedores à imunoterapia, nossos resultados não demonstraram diferença na sobrevida livre de doença entre os grupos de acordo com o SUVmax tímico ou o SUVmax esplênico, tanto antes como após início do tratamento, com ou sem correção dos valores pelo SUVmax hepático. Wong e colegas reportaram em 90 pacientes com melanoma tratados com imunoterapia que a razão entre o SUVmean (valor de captação padronizado médio) esplênico e SUVmean hepático maior que 1,1 seria preditora de pior sobrevida global, mas não de sobrevida livre de doença, e apenas para aqueles pacientes tratados com ipilimumabe (Wong et al. 2020). Existem várias diferenças técnicas entre o estudo de Wong e colegas e o nosso. Primeiramente, os autores não realizaram medidas tímicas. Ademais, nossa coorte consistia em pacientes com diferentes tipos de câncer, enquanto a deles apenas melanoma. Adicionalmente, não fizemos uma subanálise entre os sujeitos tratados exclusivamente com aCTLA-4 (ipilimumabe) ou com a-PD-1/a-PD-L1, para não diminuir o poder da nossa amostra já reduzida de sujeitos. Por fim, não realizamos a medida da razão entre o SUVmean esplênico e hepático, mas sim a razão entre o SUVmax esplênico e hepático, pois acreditamos ser o SUVmax uma medida de mais fácil mensuração e aplicabilidade. Ressaltamos que não era objeto primário do nosso estudo

a comparação entre diferentes medidas metabólicas usadas na análise de PET/CT, questão essa de discussão ativa mesmo entre especialistas em medicina nuclear (Fraum et al. 2019; Kurland et al. 2019). De certa forma, entretanto, apesar das múltiplas diferenças, nossos resultados são semelhantes aos reportados pelos autores, visto que na coorte deles o SUVmax esplênico também não foi preditor de sobrevida livre de doença.

Cabe destacar que o desafio do uso de PET/CT como biomarcador quantitativo não é exclusivo de estudos investigando imunoterapia. O desafio da padronização das medidas metabólicas é reconhecido há várias décadas e desde 2007 um consórcio de pesquisadores, profissionais de saúde e profissionais da indústria buscam maneiras de aperfeiçoar sua reprodutibilidade e quantificação precisa. Os últimos achados dessa iniciativa foram recentemente sumarizados por Kinahan e colegas (Kinahan et al. 2020). Finalmente, devido ao número reduzido de sujeitos em nossa coorte e a expertise limitada dos avaliadores nessa modalidade de imagem, acreditamos que nossos achados não são suficientemente robustos para descartar definitivamente a hipótese de que o PET/CT poderia ser um bom biomarcador de resposta à imunoterapia. Esta linha de investigação pode ser explorada em estudos futuros por um investigador qualificado, inclusive fazendo uso de alguns dos dados coletados na nossa pesquisa e disponibilizados na plataforma REDCap conforme política institucional do A.C.Camargo Cancer Center.

Nosso estudo possui outras limitações além das já citadas. Ele é um estudo retrospectivo unicêntrico de apenas 188 pacientes. Nós não coletamos dados de etnicidade ou outras variáveis clínicas que poderiam influenciar nossos resultados, inclusive o uso de corticoides durante o tratamento ou a presença de doenças autoimunes pré-existentes. Obviamente, devido à natureza retrospectiva do estudo, não fomos capazes de dividir a coorte de acordo com as métricas tímicas e esplênicas e realizar um seguimento para averiguar se havia diferenças entre os grupos. Também não comparamos a espessura tímica e o volume esplênico da nossa coorte com um grupo controle de pacientes oncológicos que foram tratados com outras modalidades terapêuticas que não a imunoterapia (quimioterapia ou radioterapia exclusiva, por exemplo). Ademais, não coletamos dados de outros possíveis biomarcadores de resposta à imunoterapia (imuno-histoquímica do PD-L1, instabilidade microsatélite, carga mutacional, entre outros) na nossa coorte e, portanto, não podemos correlacioná-los com as medidas tímicas e esplênicas encontradas. Devido ao limitado número

de eventos morte e limitado seguimento em nossa coorte, não analisamos sobrevida global como desfecho. Portanto, existe a hipótese de que embora as medidas tímicas e esplênicas encontradas não sejam preditivas de resposta à imunoterapia (exceto o volume esplênico no subgrupo de pacientes com melanoma conforme já discutido), essas métricas ainda sim podem ser fatores prognósticos de sobrevida global nesses pacientes. Os nossos dados encontram-se disponíveis na plataforma REDCap e no futuro pode ser realizada a análise de sobrevida global destes mesmos pacientes, sendo prudente esperar ao menos até 2024 ou 2025 para tentar realizar a coleta desses dados de sobrevida, sob risco de futilidade da nova análise caso não haja mortes suficientes no intervalo. Além disso, os pontos de corte propostos para dicotomização das coortes foram de certa forma arbitrários e influenciados pelo número de sujeitos, podendo, caso os achados mostrem-se reprodutíveis, serem otimizados no futuro.

Outra limitação importante do nosso estudo foi a inclusão de uma coorte heterogênea de pacientes tratados com imunoterapia. Na busca de um biomarcador de imagem universal aplicável a todos os pacientes potencialmente elegíveis à imunoterapia, incluímos no estudo desde tipos tumorais que sabidamente apresentam melhor resposta à imunoterapia, como melanoma, quanto tipos tumorais em que o uso do tratamento não é bem estabelecido ou encontra-se em estágio experimental, como pacientes com neoplasia prostática ou mamária. Dito isso, nossa estratégia não é única na literatura relacionada à imunoterapia. Devido ao seu mecanismo de ação, diversos outros biomarcadores de resposta à imunoterapia foram propostos de maneira agnóstica à histologia da neoplasia primária. Por exemplo, há uma variedade de artigos investigando a carga tumoral mutacional agrupando os achados de diferentes tipos histológicos (Lawrence et al. 2013; Miao et al. 2018; Samstein et al. 2019; Yang et al. 2020; Chida et al. 2021; Cao et al. 2022). Outro exemplo é o uso da instabilidade microsatélite como biomarcador independentemente do tipo tumoral primário (Goodman et al. 2019). Inclusive a imuno-histoquímica para detecção de PD-L1 é um biomarcador usado independente da histologia primária (Kim et al. 2017), embora haja diferentes pontos de cortes para cada tipo tumoral, além de diferenças entre qual compartimento do tumor (apenas células imunes, apenas células tumorais ou estroma) deve ser avaliado na análise (Davis e Patel 2019), fato este que corrobora a alta complexidade da busca de um biomarcador universal de resposta à imunoterapia.

Nosso estudo foi realizado com pacientes reais de um centro oncológico de referência no Brasil, nível de cuidado terciário/quaternário. A indicação de imunoterapia foi feita com base na decisão conjunta entre o paciente e o seu oncologista. É possível que alguns pacientes não teriam sido candidatos formais à imunoterapia em estudos controlados. Entretanto, a ausência de critérios rígidos formais para a indicação do tratamento também torna nosso estudo mais generalizável externamente e com maior potencial de aplicação clínica. Da mesma forma, como o estudo retrospectivo foi realizado em um ambiente de cuidado real não-controlado, não conseguimos controlar quais pacientes foram avaliados por tomografia, PET/CT ou ressonância magnética, embora não acreditemos que o método de imagem influencie o resultado das medidas realizadas.

Nesta mesma linha, o tempo entre o exame pré-tratamento, início da terapia e o primeiro exame de avaliação de resposta não foi padronizado como em um estudo clínico. Mas os valores encontrados no nosso estudo, mediana de 22 dias antes do início da terapia para exame pré-tratamento e 75 dias para primeira avaliação de resposta, nos parecem razoáveis e dentro dos comumente praticados em estudos randomizados. Uma análise multivariada que incorporasse o tempo entre o início da imunoterapia e a data de realização do exame como variável adicional poderia levar a resultados diferentes. Entretanto, acreditamos que uma análise multivariada não seria adequada à nossa coorte devido ao limitado número de sujeitos e eventos (progressão), correndo o risco de reduzirmos o número de eventos por variável a níveis estatisticamente questionáveis (Harrell et al. 1985; van Domburg et al. 2014). Ademais, desconhecemos o quanto outros fatores clínicos podem influenciar a espessura tímica e o volume esplênico. Sem coleta prospectiva e controle adequado deste fatores, poderíamos incorrer no risco de um resultado artificialmente significativo devido a covariância com outra variável clínica importante (Concato 1993). Feitas estas ressalvas, ao menos em relação ao volume esplênico, acreditamos que a variação na data do primeiro exame de resposta não deve ter grande influência sobre nossos resultados, a julgar pelos dados de pacientes com melanoma tratados com imunoterapia (Susok et al. 2021), em que o aumento do volume esplênico no primeiro exame pós tratamento realizado com 3 meses se mantém relativamente estável durante os primeiros 12 meses de seguimento.

5 CONCLUSÕES

- Nosso estudo não revelou correlação entre a espessura do timo calculada através de exames de imagem de rotina oncológica (tomografia computadorizada ou PET/CT) e sobrevida livre de progressão em pacientes oncológicos tratados com imunoterapia.
- Em relação ao papel do baço na resposta imune contra o câncer, corroboramos o fenômeno já descrito na literatura que a maior parte dos pacientes tem aumento do volume esplênico após iniciar o tratamento. Entretanto, não conseguimos validar essa métrica como biomarcador de resposta por imagem independentemente do tipo histológico da neoplasia.
- Maior volume esplênico está associado a pior sobrevida livre de progressão em pacientes com melanoma tratados com imunoterapia, mas essa correlação não pôde ser replicada em outras neoplasias. Encorajamos a validação prospectiva desse biomarcador em uma maior coorte multicêntrica.
- Não houve alterações significativas do metabolismo tímico ou esplênico após o início da imunoterapia calculados através da medida do SUVmax em exames de PET/CT. Tanto o metabolismo tímico como o metabolismo esplênico não se correlacionaram com sobrevida livre de progressão.
- A distribuição da espessura tímica e do volume esplênico não são normais.
- Não houve correlação entre a espessura do timo e o volume esplênico em nossa coorte.
- Evidenciou-se correlação muito forte entre o volume esplênico semiautomático (padrão-ouro) e o volume esplênico calculado utilizando-se uma fórmula tridimensional; correlação forte entre o volume esplênico e tanto o comprimento como a largura esplênica; correlação moderada entre o volume esplênico e a espessura esplênica.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do papel essencial do timo na regulação do sistema imune, inclusive na resposta imune antitumoral (Miller 2011; Bluestone e Anderson 2020), nosso estudo não revelou correlação entre a espessura do timo calculada através de exames de imagem de rotina oncológica (tomografia computadorizada ou PET/CT) e desfechos clínicos em pacientes oncológicos tratados com imunoterapia. Nosso objetivo inicial era usar uma medida simples facilmente executável na rotina clínica para avaliar o timo. A execução do estudo nos mostrou que essa medida, embora simples, talvez não fosse acurada. Para investigações futuras, sugerimos o uso de outras técnicas de avaliação do timo por imagem, com maior ênfase na sua composição e não no seu tamanho. Alternativamente, a volumetria de todo o timo auxiliada por inteligência artificial ainda pode ser uma técnica de investigação viável.

Em relação ao papel do baço na resposta imune contra o câncer, corroboramos o fenômeno já descrito na literatura que a maior parte dos pacientes tem aumento do volume esplênico ao iniciar o tratamento (Ji et al. 2019; Galland et al. 2021; Susok et al. 2021). Entretanto, não conseguimos validar essa métrica como biomarcador de imagem independentemente do tipo histológico. Na subanálise por tipo de neoplasia, concluímos que o volume esplênico pré-tratamento poderia ser usado como fator preditivo de resposta em pacientes com melanoma, e encorajamos a validação prospectiva desse biomarcador em uma maior coorte multicêntrica.

Esperamos que nosso estudo tenha avançado o conhecimento e a busca de biomarcadores de resposta à imunoterapia. Apesar das limitações dos biomarcadores invasivos atuais, que necessitam de biópsia e possuem performance limitadas, o estudo atual não foi capaz de propor uma alternativa por imagem robusta o suficiente como biomarcador de resposta. Existem várias frentes de investigação de biomarcadores de resposta em imunoterapia utilizando exames de imagem, uma das mais encorajadoras sendo o uso de PET/CT com radiofármacos conjugados diretamente ao PD-L1 (Bensch et al. 2018). Não obstante, acreditamos que nossos dados encorajam estudos futuros especialmente sobre o papel do baço na resposta ao câncer em pacientes tratados com imunoterapia.

7 REFERÊNCIAS

- Aarnink A, Richard C, Truntzer C, Vincent J, Bengrine L, Vienot A, et al. Baseline splenic volume as a surrogate marker of FOLFIRINOX efficacy in advanced pancreatic carcinoma. *Oncotarget*. 22 de maio de 2018;9(39):25617–29.
- Baron RL, Lee JK, Sagel SS, Peterson RR. Computed tomography of the normal thymus. *Radiology*. janeiro de 1982;142(1):121–5.
- Bensch F, van der Veen EL, Lub-de Hooge MN, Jorritsma-Smit A, Boellaard R, Kok IC, et al. ⁸⁹Zr-atezolizumab imaging as a non-invasive approach to assess clinical response to PD-L1 blockade in cancer. *Nat Med*. 26 de dezembro de 2018;24(12):1852–8.
- Bezerra AS, D’Ippolito G, Faintuch S, Szejnfeld J, Ahmed M. Determination of Splenomegaly by CT: Is There a Place for a Single Measurement? *Am J Roentgenol*. maio de 2005;184(5):1510–3.
- Bluestone JA, Anderson M. Tolerance in the Age of Immunotherapy. *N Engl J Med*. 2020;383(12):1156–66.
- Bronte V, Pittet MJ. The Spleen in Local and Systemic Regulation of Immunity. *Immunity*. novembro de 2013;39(5):806–18.
- Cao J, Yang X, Chen S, Wang J, Fan X, Fu S, et al. The predictive efficacy of tumor mutation burden in immunotherapy across multiple cancer types: A meta-analysis and bioinformatics analysis. *Transl Oncol*. junho de 2022;20:101375.
- Carter BW, Bhosale PR, Yang WT. Immunotherapy and the role of imaging. *Cancer*. 2018;124(14):2906–22.
- Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, Swanton C, Quezada SA, Stenzinger A, et al. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Ann Oncol*. janeiro de 2019;30(1):44–56.
- Chida K, Kawazoe A, Kawazu M, Suzuki T, Nakamura Y, Nakatsura T, et al. A Low Tumor Mutational Burden and PTEN Mutations Are Predictors of a Negative Response to PD-1

- Blockade in MSI-H/dMMR Gastrointestinal Tumors. *Clin Cancer Res.* 1 de julho de 2021;27(13):3714–24.
- Chiou VL, Burotto M. Pseudoprogession and immune-related response in solid tumors. *Journal of Clinical Oncology.* 2015.
- Choi SJ, Lee SS, Jung KH, Lee JB, Kang HJ, Park HJ, et al. Noncirrhotic Portal Hypertension after Trastuzumab Emtansine in HER2-positive Breast Cancer as Determined by Deep Learning–measured Spleen Volume at CT. *Radiology.* 9 de agosto de 2022;
- Choyke P, Zeman R, Gootenberg J, Greenberg J, Hoffer F, Frank J. Thymic atrophy and regrowth in response to chemotherapy: CT evaluation. *Am J Roentgenol.* agosto de 1987;149(2):269–72.
- Cohen M, Hill C, Cangir A, Sullivan M. Thymic rebound after treatment of childhood tumors. *Am J Roentgenol.* julho de 1980;135(1):151–6.
- Concato J. The Risk of Determining Risk with Multivariable Models. *Ann Intern Med.* 1 de fevereiro de 1993;118(3):201.
- Cortez-Retamozo V, Etzrodt M, Newton A, Rauch PJ, Chudnovskiy A, Berger C, et al. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci.* 14 de fevereiro de 2012;109(7):2491–6.
- Davis AA, Patel VG. The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker: an analysis of all US Food and Drug Administration (FDA) approvals of immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer.* 26 de dezembro de 2019;7(1):278.
- van Domburg R, Hoeks S, Kardys I, Lenzen M, Boersma E. Tools and Techniques - Statistics: How many variables are allowed in the logistic and Cox regression models? *EuroIntervention.* abril de 2014;9(12):1472–3.
- Francis I, Glazer G, Bookstein F, Gross B. The thymus: reexamination of age-related changes in size and shape. *Am J Roentgenol.* agosto de 1985;145(2):249–54.
- Fraum TJ, Fowler KJ, Crandall JP, Laforest RA, Salter A, An H, et al. Measurement Repeatability of 18 F-FDG PET/CT Versus 18 F-FDG PET/MRI in Solid Tumors of the Pelvis. *J Nucl Med.* agosto de 2019;60(8):1080–6.

- Gabrilovich DI. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res.* 1 de janeiro de 2017;5(1):3–8.
- Galland L, Lecuelle J, Favier L, Fraisse C, Lagrange A, Kaderbhai C, et al. Splenic volume as a surrogate marker of immune checkpoint inhibitor efficacy in metastatic non small cell lung cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(12):1–13.
- Gambhir SS. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer.* setembro de 2002;2(9):683–93.
- de Geer G, Webb WR, Gamsu G. Normal thymus: assessment with MR and CT. *Radiology.* fevereiro de 1986;158(2):313–7.
- Goodman AM, Sokol ES, Frampton GM, Lippman SM, Kurzrock R. Microsatellite-Stable Tumors with High Mutational Burden Benefit from Immunotherapy. *Cancer Immunol Res.* 1 de outubro de 2019;7(10):1570–3.
- Harrell FE, Lee KL, Matchar DB, Reichert TA. Regression models for prognostic prediction: advantages, problems, and suggested solutions. *Cancer Treat Rep.* outubro de 1985;69(10):1071–7.
- Haslam A, Prasad V. Estimation of the Percentage of US Patients With Cancer Who Are Eligible for and Respond to Checkpoint Inhibitor Immunotherapy Drugs. *JAMA Netw Open.* 3 de maio de 2019;2(5):e192535.
- 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.* 19 de agosto de 2010;363(8):711–23.
- Hwang S, Panicek DM. Magnetic resonance imaging of bone marrow in oncology, Part 2. *Skeletal Radiol.* 28 de setembro de 2007;36(11):913–20.
- Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* novembro de 1992;11(11):3887–95.
- Ji C, Roy MD, Golas J, Vitsky A, Ram S, Kumpf SW, et al. Myocarditis in Cynomolgus Monkeys Following Treatment with Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin Cancer Res.* 1 de agosto

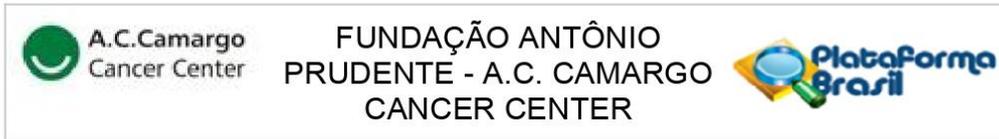
- de 2019;25(15):4735–48.
- Kennedy LB, Salama AKS. A review of cancer immunotherapy toxicity. *CA Cancer J Clin.* março de 2020;70(2):86–104.
- Kim ST, Klempner SJ, Park SH, Park JO, Park YS, Lim HY, et al. Correlating programmed death ligand 1 (PD-L1) expression, mismatch repair deficiency, and outcomes across tumor types: implications for immunotherapy. *Oncotarget.* 29 de setembro de 2017;8(44):77415–23.
- Kinahan PE, Perlman ES, Sunderland JJ, Subramaniam R, Wollenweber SD, Turkington TG, et al. The QIBA Profile for FDG PET/CT as an Imaging Biomarker Measuring Response to Cancer Therapy. *Radiology.* março de 2020;294(3):647–57.
- Kissin CM, Husband JE, Nicholas D, Eversman W. Benign thymic enlargement in adults after chemotherapy: CT demonstration. *Radiology.* abril de 1987;163(1):67–70.
- Kurland BF, Peterson LM, Shields AT, Lee JH, Byrd DW, Novakova-Jiresova A, et al. Test–Retest Reproducibility of 18 F-FDG PET/CT Uptake in Cancer Patients Within a Qualified and Calibrated Local Network. *J Nucl Med.* maio de 2019;60(5):608–14.
- Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2 de julho de 2015;373(1):23–34.
- Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov G V., Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature.* 16 de julho de 2013;499(7457):214–8.
- Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science (80-).* 22 de março de 1996;271(5256):1734–6.
- Lee JB, Kim HR, Ha SJ. Immune Checkpoint Inhibitors in 10 Years: Contribution of Basic Research and Clinical Application in Cancer Immunotherapy. *Immune Netw.* 2022;22(1).
- Levy L, Mishalian I, Bayuch R, Zolotarov L, Michaeli J, Fridlender ZG. Splenectomy inhibits non-small cell lung cancer growth by modulating anti-tumor adaptive and innate immune response. *Oncoimmunology.* 3 de abril de 2015;4(4):e998469.

- Markel JE, Noore J, Emery EJ, Bobnar HJ, Kleinerman ES, Lindsey BA. Using the Spleen as an in Vivo Systemic Immune Barometer Alongside Osteosarcoma Disease Progression and Immunotherapy with α -PD-L1. *Sarcoma*. 2018;2018.
- Mehta AK, Cheney EM, Hartl CA, Pantelidou C, Oliwa M, Castrillon JA, et al. Targeting immunosuppressive macrophages overcomes PARP inhibitor resistance in BRCA1-associated triple-negative breast cancer. *Nat Cancer*. 14 de janeiro de 2021;2(1):66–82.
- Mehta S, Shelling A, Muthukaruppan A, Lasham A, Blenkiron C, Laking G, et al. Predictive and prognostic molecular markers for cancer medicine. *Ther Adv Med Oncol*. 5 de março de 2010;2(2):125–48.
- Miao D, Margolis CA, Vokes NI, Liu D, Taylor-Weiner A, Wankowicz SM, et al. Genomic correlates of response to immune checkpoint blockade in microsatellite-stable solid tumors. *Nat Genet*. 27 de setembro de 2018;50(9):1271–81.
- Miller JFAP. The golden anniversary of the thymus. Vol. 11, *Nature reviews. Immunology*. England; 2011. p. 489–95.
- Moore A, Korobkin M, Olanow W, Heaston D, Ram P, Dunnick N, et al. Age-related changes in the thymus gland: CT-pathologic correlation. *Am J Roentgenol*. agosto de 1983;141(2):241–6.
- Niogret J, Limagne E, Thibaudin M, Blanc J, Bertaut A, Le Malicot K, et al. Baseline Splenic Volume as a Prognostic Biomarker of FOLFIRI Efficacy and a Surrogate Marker of MDSC Accumulation in Metastatic Colorectal Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 31 de maio de 2020;12(6):1429.
- Nishino M, Ashiku SK, Kocher ON, Thurer RL, Boiselle PM, Hatabu H. The Thymus: A Comprehensive Review. *RadioGraphics*. março de 2006;26(2):335–48.
- Ollivier L. Improving the interpretation of bone marrow imaging in cancer patients. *Cancer Imaging*. 2006;6(1):194–8.
- Pickhardt PJ. Value-added Opportunistic CT Screening: State of the Art. *Radiology*. maio de 2022;303(2):241–54.
- Pickhardt PJ, Graffy PM, Perez AA, Lubner MG, Elton DC, Summers RM. Opportunistic

- Screening at Abdominal CT: Use of Automated Body Composition Biomarkers for Added Cardiometabolic Value. *RadioGraphics*. março de 2021;41(2):524–42.
- Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, Hellmann MD, Shen R, Janjigian YY, et al. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet*. 14 de fevereiro de 2019;51(2):202–6.
- Schwenck J, Schörg B, Fiz F, Sonanini D, Forschner A, Eigentler T, et al. Cancer immunotherapy is accompanied by distinct metabolic patterns in primary and secondary lymphoid organs observed by non-invasive in vivo 18 F-FDG-PET. *Theranostics*. 2020;10(2):925–37.
- 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. *The Lancet Oncology*. 2017.
- Susok L, Reinert D, Lukas C, Stockfleth E, Gambichler T. Volume increase of spleen in melanoma patients undergoing immune checkpoint blockade. *Immunotherapy*. agosto de 2021;13(11):885–91.
- Taveira MDO, Silva MJ de B e, Barbosa PNVP. Imaging-calculated splenic volume is associated with response in melanoma patients treated with immunotherapy. *Immunotherapy*. *In press*.
- Tran G, Zafar SY. Financial toxicity and implications for cancer care in the era of molecular and immune therapies. *Ann Transl Med*. maio de 2018;6(9):166–166.
- Ugel S, Peranzoni E, Desantis G, Chioda M, Walter S, Weinschenk T, et al. Immune Tolerance to Tumor Antigens Occurs in a Specialized Environment of the Spleen. *Cell Rep*. setembro de 2012;2(3):628–39.
- Wang C, Wang H nan, Wang L. Biomarkers for predicting the efficacy of immune checkpoint inhibitors. *J Cancer*. 2022;13(2):481–95.
- Weis LN, Tolaney SM, Barrios CH, Barroso-Sousa R. Tissue-agnostic drug approvals: how does this apply to patients with breast cancer? *npj Breast Cancer*. 13 de dezembro de 2021;7(1):120.

- Wen SW, Everitt SJ, Bedó J, Chabrot M, Ball DL, Solomon B, et al. Spleen Volume Variation in Patients with Locally Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Receiving Platinum-Based Chemo-Radiotherapy. St-Pierre Y, organizador. PLoS One. 24 de novembro de 2015;10(11):e0142608.
- Wolchok JD, Hoos A, O'Day S, Weber JS, Hamid O, Lebbé C, et al. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: Immune-related response criteria. Clin Cancer Res. 2009;
- Wong A, Callahan J, Keyaerts M, Neyns B, Mangana J, Aberle S, et al. 18F-FDG PET/CT based spleen to liver ratio associates with clinical outcome to ipilimumab in patients with metastatic melanoma. Cancer Imaging. 14 de dezembro de 2020;20(1):36.
- Yang RK, Qing Y, Jelloul FZ, Routbort MJ, Wang P, Shaw K, et al. Identification of biomarkers of immune checkpoint blockade efficacy in recurrent or refractory solid tumor malignancies. Oncotarget. 11 de fevereiro de 2020;11(6):600–18.
- Zhao P, Li L, Jiang X, Li Q. Mismatch repair deficiency/microsatellite instability-high as a predictor for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy efficacy. J Hematol Oncol. 31 de dezembro de 2019;12(1):54.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP (projeto original)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Comparação de critérios radiológicos de avaliação de resposta oncológica em pacientes tratados com imunoterapia: uma análise retrospectiva

Pesquisador: Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 07363419.4.0000.5432

Instituição Proponente: FUNDACAO ANTONIO PRUDENTE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.280.881

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo de coorte, com coleta retrospectiva, analítico, observacional, unicêntrico, que será desenvolvido no Departamento de Imagem do A.C. Camargo Cancer Center.

Será realizado um estudo retrospectivo dos exames de tomografia computadorizada dos pacientes tratados com imunoterapia no A.C. Camargo Cancer Center entre 2016-2018. Os exames serão avaliados por dois radiologistas independentemente usando tanto o paradigma RECIST 1.1 como o iRECIST.

Objetivo da Pesquisa:

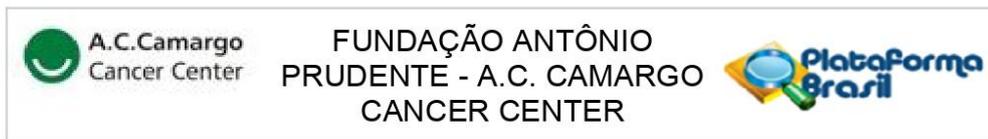
Objetivo Primário:

- Comparar a performance dos critérios de avaliação de resposta do iRECIST e RECIST 1.1 em pacientes oncológicos em uso de imunoterapia.

Objetivo Secundário:

- Subanálise dos padrões de resposta pelo iRECIST de acordo com o tipo da neoplasia primária.
- Análise exploratória de correlação entre dados clínicos, achados radiológicos, resposta radiológica e resposta clínica.
- Quantificar a incidência de efeitos adversos nessa coorte.
- Avaliar a concordância entre dois observadores no uso do iRECIST numa população de pacientes tratados com imunoterapia e observar se ela difere da concordância dos mesmos observadores ao usar o

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_hcancer@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 3.280.881

RECIST 1.1. • Correlacionar o padrão de resposta radiológica encontrada no RECIST 1.1 e no iRECIST com a resposta clínica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Há o risco, não intencional, de quebra de confidencialidade. Os riscos serão minimizados pelos pesquisadores.

Benefícios: Aprimorar a aplicação do iRECIST aos pacientes em uso de imunoterapia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Encaminhado resposta de pendência, com inclusão de pesquisador e termo de ciência do departamento de Oncologia Clínica do ACCCC.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

De acordo com a resposta à pendência.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Este Comitê não identifica objeção ética ou pendências/inadequações envolvendo o projeto proposto.

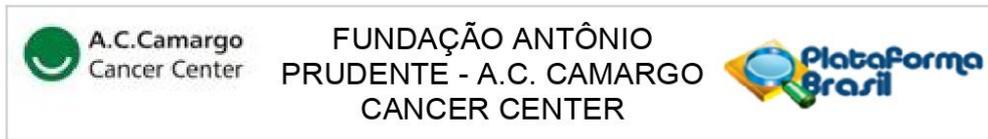
Considerações Finais a critério do CEP:

Nota: Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses a partir desta data em relatório (modelo CEP).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1290536.pdf	27/03/2019 16:29:47		Aceito
Outros	resposta_pendencia.pdf	27/03/2019 16:29:25	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ciencia_oncologia.pdf	27/03/2019 16:28:27	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	formulariosub.pdf	05/02/2019 16:08:25	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	lattes.pdf	05/02/2019 16:07:57	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termocomptomisso.pdf	05/02/2019 16:07:52	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_hcancer@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 3.280.881

Declaração de Pesquisadores	dadoscoletados.pdf	05/02/2019 16:07:25	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ciencia.pdf	05/02/2019 16:07:20	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	infraimagem.pdf	05/02/2019 16:07:06	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	05/02/2019 16:06:58	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_pdf.pdf	05/02/2019 16:06:34	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensatcle.pdf	05/02/2019 16:06:26	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
Folha de Rosto	rostoassinada.PDF	05/02/2019 16:06:11	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

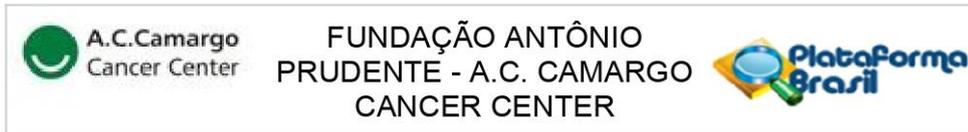
Não

SAO PAULO, 24 de Abril de 2019

Assinado por:
Sandra Caires Serrano
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_hcancer@accamargo.org.br

Anexo 2 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP (mudança do projeto)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação por imagem de medidas esplênicas e tímicas como biomarcadores de resposta em pacientes com câncer tratados com imunoterapia

Pesquisador: Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 07363419.4.0000.5432

Instituição Proponente: FUNDACAO ANTONIO PRUDENTE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.071.614

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1802981_E1, submetido em 31/08/2021.

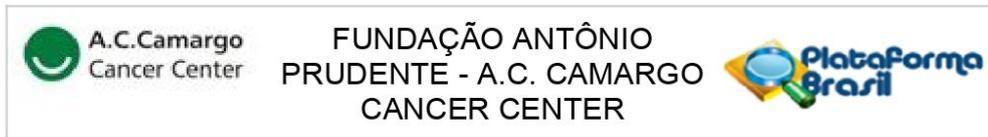
A presente emenda trata de modificações no projeto de pesquisa, documento "PROJETO_VERSAO2", submetido em 10/08/2021. A justificativa para esta solicitação foi apresentada no documento "CARTA_EMENDA", submetido em 31/08/2021 e descreve a impossibilidade de execução do projeto original, aprovado pelo CEP e iniciado em 05/2019, devido a problemas com a metodologia, perda de imagens do arquivo digital da instituição além de casuística com tamanho e desfecho insuficientes.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO:

Avaliar o volume do timo e do baço antes e após o uso de imunoterapia para tratamento oncológico e verificar se o volume pré-tratamento e/ou a variação se correlacionam com desfechos clínicos de resposta oncológica (progressão livre de doença, proporção de resposta completa).

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 5.071.614

OBJETIVO SECUNDÁRIO:

Se a hipótese principal se mostrar verdadeira (i.e., há diferenças no volume pré- tratamento ou na variação após tratamento), calcular um valor de medida tímica e esplênica para uso clínico para diferenciar os bons respondedores versus maus respondedores à imunoterapia e calcular a sensibilidade, especificidade e acurácia dessas medidas. No subgrupo de pacientes que foram submetidos a PET/CT, quantificar a atividade metabólica do timo e baço em relação ao fígado antes e após o uso de imunoterapia através da medida do SUV (Standardized Uptake Value) e verificar se o SUV pré-tratamento e/ou a variação se correlaciona com desfechos clínicos de resposta oncológica (sobrevida global, sobrevivida livre de doença, tempo até falha do tratamento).

Avaliar se há alta correlação entre medidas unidimensionais do baço e a volumetria esplênica e se o volume esplênico apresenta uma curva de distribuição normal em pacientes oncológicos.

Avaliar se há correlação entre as medidas do timo e baço em pacientes oncológicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme apresentado pela pesquisadora, lê-se; RISCOS: “Há o risco, não intencional, de quebra de confidencialidade. Os riscos serão minimizados pelos pesquisadores”

Conforme apresentado pela pesquisadora, lê-se; BENEFÍCIOS: “Avaliar se uma medida simples unidimensional substitui a volumetria para estimativa do volume esplênico e explorar se há mudança da atividade metabólica dos órgãos avaliados antes e após tratamento”

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

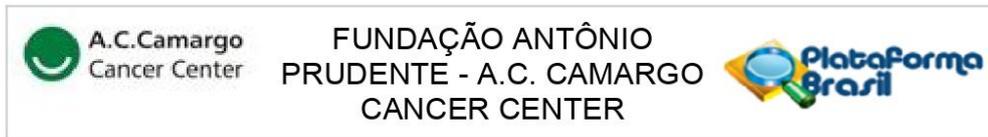
Trata-se de EMENDA 1:

O documento alterado na presente emenda foi:

PROJETO DE PESQUISA - Versão 2, documento “PROJETO_VERSAO2”, submetido em 10/08/2021.

Razão principal para alteração: Modificações no título do projeto, resumo, introdução, justificativa, objetivos, metodologia, critérios de inclusão e exclusão, variáveis coletadas e resultados esperados.

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 5.071.614

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou pendências e lista de inadequações".

Recomendações:

Caso a coleta de novos dados para o projeto em questão seja feita a partir de sistemas não anonimizados da Instituição (como por exemplo H2TC) recomenda-se o envio de emenda para o CEP, juntamente com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para apreciação deste comitê e posterior aplicação aos participantes de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos na emenda apresentada. Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da emenda proposta para o projeto de pesquisa.

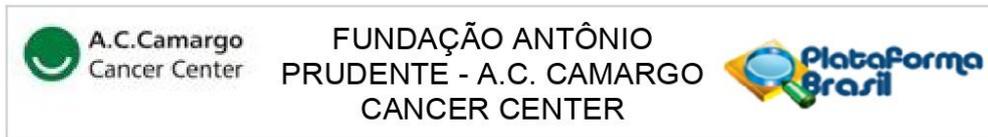
Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa do A.C. Camargo Cancer Center manifesta-se pela aprovação da emenda

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1802981_E1.pdf	31/08/2021 15:48:16		Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTA_EMENDA.pdf	31/08/2021 15:44:14	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	PROJETO_VERSAO2.pdf	10/08/2021 11:47:12	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	PROJETO_APROVADO_COM_ALTERACOES.docx	10/08/2021 11:46:54	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
Folha de Rosto	FR_ASSINADA.pdf	10/08/2021 11:46:17	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
Outros	resposta_pendencia.pdf	27/03/2019 16:29:25	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ciencia_oncologia.pdf	27/03/2019 16:28:27	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	formulariosub.pdf	05/02/2019 16:08:25	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	lattes.pdf	05/02/2019 16:07:57	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
Declaração de	termocomptomisso.pdf	05/02/2019	Paula Nicole Vieira	Aceito

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 5.071.614

Pesquisadores	termocomptomisso.pdf	16:07:52	Pinto Barbosa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	dadoscoletados.pdf	05/02/2019 16:07:25	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ciencia.pdf	05/02/2019 16:07:20	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	infraimagem.pdf	05/02/2019 16:07:06	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	05/02/2019 16:06:58	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_pdf.pdf	05/02/2019 16:06:34	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensatcle.pdf	05/02/2019 16:06:26	Paula Nicole Vieira Pinto Barbosa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 29 de Outubro de 2021

Assinado por:
Sandra Caires Serrano
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br

Anexo 3 – Comprovante de aceitação de manuscrito para publicação

Immunotherapy - Decision on Manuscript ID IMT-2022-0222.R2

Lauren Coyle <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Dear Dr. de Oliveira Taveira,

Thank you for all of your work in the revision of your manuscript. It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Imaging-calculated splenic volume is associated with response in melanoma patients treated with immunotherapy" in its current form for publication in Immunotherapy. Next, our production department will be in touch with the galley proofs for your approval - please do let me know if you are going to be away at any point and unable to check them. The manuscript will be uploaded into the Production system (PXE) for your initial review (please note that this is usually text-only, excluding Figures), and once you return your first round of comments on this, a Production Editor will be in touch in due course to complete the process (including providing a further proof including any Figures). Please note that, depending on the number of articles in the journal pipeline, the time between the initial PXE email and the Production Editor's follow-up email can vary. If you have any queries in the interim, please do not hesitate to email me,

However, before we proceed to production of your article, I would appreciate it if you can fill out the Author Disclosure and Copyright Assignment forms (available here: <https://www.futuremedicine.com/authorguide>, in the section "Submitting & tracking your article"), if you haven't already done so. Please note that the copyright form must be signed by hand or with an electronic signature.

We are also able to offer a fast-track production service, for a fee of \$1300, providing guaranteed online publication within 3 weeks (subject to turnaround of proofs by the author within 3 working days). Should you be interested in this service, please let me know,

Common errors to check and watch out for when approving your proofs (those that are harder for our copy editors to catch):

- Have you listed all your co-authors, and spelt their names correctly?
- Have you included correct affiliation details for yourself and your co-authors?
- Have you included all your funding information, including grant numbers, in the acknowledgement section (i.e., NIH, Wellcome Trust, etc.)?

Although corrections can be made after publication, these will only be carried out if they are deemed by the editor to be critical to the understanding of the article. So it is important to check information such as the above is correct when the article goes to print, as it cannot always be corrected at a later date.

Immunotherapy offers an open access option, whereby for a fee, articles can be made freely available for all to read. Pricing varies by article type; for peer-reviewed content (i.e., Original Research or Review articles), the fee is \$3900; for content not reviewed externally (i.e., Editorials or Commentaries), the fee is \$1300. For more information, visit our website here: <https://www.futuremedicine.com/authorguide/openaccess>. If you are interested in taking this option, please let me know. Please note, if you would like to opt for Open Access, the OA form (available here: <https://www.futuremedicine.com/authorguide/openaccess>) will be required in place of the Copyright Assignment form.

{FOR ONCOLOGY ARTICLES ONLY} Immunotherapy is associated with our digital hub, Oncology Central (<https://www.oncology-central.com>), an online community offering medical professionals with an interest in oncology easy access to breaking news, peer-reviewed articles and multimedia content. For a fee, your article can be featured on Oncology Central over a 4-week period and made exclusively accessible to the ~16,000 oncology professionals registered on this site. The article abstract will be hosted on Oncology Central, with a direct link to the article PDF, featured on the homepage, shared via social media (to >160,000 followers) and highlighted in the weekly newsletter. This further inclusion on Oncology Central will automatically ensure your article reaches its target audience, helping to increase its readership and extend its impact. Do let me know if this is of interest.