

Imunomodulação de células cancerosas por imunoterapias CAR-T, mAbs, CTLA-4 e neoantígenos direcionados

Immunomodulation of cancer cells by CAR-T, mAbs, CTLA-4 and targeted neoantigens

Imunomodulación de células cancerosas por inmunoterapias CAR-T, mAbs, CTLA-4 y neoantígenos dirigidos

Marcos Daniel Mendes Padilha^{1*}, Sérgio Augusto Antunes Ramos¹, Alice Carters Duarte², Raissa Melo de Sousa¹, Oscar David Albito Balcazar¹, Camila Lorena Rodrigues Machado³, Clebson Pantoja Pimentel³, Kelly Emi Hirai³, Gleyciane Machado da Costa¹, Gustavo Moraes Holanda³.

RESUMO

Objetivo: Elucidar o perfil imunomodulador e farmacocinético de terapias com CAR-T, CTLA-4, mAbs com adjuvantes e combinadas para uso clínico em células humanas. **Métodos:** Trata-se de um estudo de revisão integrativa com análise sistemática, as bases de dados consultadas foram o NCBI, BVS, Scielo, Pubmed, Periódicos Capes e LILACS. 162 artigos foram identificados e apenas 37 selecionados para a revisão, as palavras chaves foram padronizadas de acordo com os Descritores em Ciências da Saúde (DeCs) e os artigos categorizados na íntegra. **Resultados:** Os achados reforçam o perfil molecular de CAR-T como alternativas para depleção de células cancerosas, mAbs são estratégias que já possuem uso clínico e aprovado, potencializando sua combinação com CTLA-4 responsivo a ativação gênica gerou respostas anticancerosas mais robustas. Neoantígenos são estratégias promissoras e possuem capacidade de modular respostas específicas para células T e podem ser utilizados como futuros alvos para produção de vacinas anticâncer. **Considerações finais:** As estratégias atuais de imunoterapia estão potencializando uma cura para o câncer, entretanto outros mecanismos precisam ser mais investigados como no caso de tumores sólidos o que torna uma limitação.

Palavras-chave: Imunoterapia adotiva, Terapia CAR com células T, MABs antineoplásicos, Inibidores de checkpoint imunológico.

ABSTRACT

Objective: Elucidate the immunomodulatory and pharmacokinetic profile of therapies with CAR-T, CTLA-4, mAbs with adjuvants and combined for clinical use in human cells. **Methods:** This is an integrative review study with systematic analysis, the databases where the articles were searched were NCBI, BVS, Scielo, Pubmed, Periódicos Capes and LILACS. 162 articles were identified and only 37 selected for review, the keywords were standardized according to the descriptors in health sciences (DeCs) and the articles categorized in full. **Results:** The findings reinforce the molecular profile of CAR-T as alternatives for depletion of cancer cells, mAbs are strategies that already have clinical and approved use, potentiating its combination with CTLA-4 responsive gene activation generated more robust anticancer responses. Neoantigens are promising strategies and have the ability to modulate specific responses to T cells and can be used as future

¹ Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém - PA. *E-mail: maecosdaniel@yahoo.com.br

² Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém - PA.

³ Universidade da Amazônia (UNAMA), Belém - PA.

targets for the production of anticancer vaccines. **Final considerations:** Current immunotherapy strategies are potentiating a cure for cancer, however other mechanisms need to be further investigated as in the case of solid tumors which makes it a limitation.

Keywords: Adoptive immunotherapy, CAR t-cell therapy, Antineoplastic MABs, Immune checkpoint inhibitors.

RESUMEN

Objetivo: Dilucidar el perfil inmunomodulador de terapias con CAR-T, CTLA-4, mAbs con adyuvantes y combinados para uso clínico en células humanas. **Métodos:** Este es un estudio de revisión integradora con análisis sistemático, las bases de datos consultadas fueron NCBI, BVS, Scielo, Pubmed, Periódicos Capes y LILACS. Se identificaron 162 artículos y solo 37 fueron seleccionados para su revisión, las palabras clave se estandarizaron de acuerdo con los descriptores en ciencias de la salud (DeCs) y los artículos categorizados en su totalidad. **Resultados:** Los hallazgos refuerzan el perfil molecular de CAR-T como alternativas para el agotamiento de las células cancerosas, los mAbs son estrategias que ya tienen uso clínico y aprobado, potenciando su combinación con la activación del gen sensible CTLA-4 generando respuestas anticancerígenas más robustas. Los neoantígenos son estrategias prometedoras y tienen la capacidad de modular respuesta específica a las células T y pueden usarse como objetivos futuros para la producción de vacunas contra el cáncer. **Consideraciones finales:** Las estrategias actuales de inmunoterapia están mejorando una cura para el cáncer, sin embargo, otros mecanismos deben investigarse más a fondo, como en el caso de los tumores sólidos, lo que lo convierte en una limitación.

Palabras clave: Inmunoterapia adoptiva, Terapia con células T-CAR, MABs antineoplásicos, Inhibidores del punto de control inmunitario.

INTRODUÇÃO

Em 2018 James P. Allison e Tasuko Honjo ganharam o Nobel de Medicina e Fisiologia, eles demonstraram que o antígeno 4 de linfócito T regula negativamente a ativação de células do sistema imunológico, estando relacionado ao crescimento de tumores. Foi possível então, inibir a atividade CTLA-4 fazendo uso de anticorpos anti-CTLA-4, permitindo assim o restabelecimento da condição homeostática (TEIXEIRA HC, et al., 2019).

A modificação genética de linfócitos T com receptores de antígenos quiméricos (CARs), permite o reconhecimento de células tumorais por células T específicas. A incorporação de moléculas coestimuladoras, citocinas ou mAbs (anticorpos monoclonais de células B) pode induzir a apoptose de células cancerosas por células T projetadas. Os CARs são gerados pela fusão da região de ligação ao antígeno de um anticorpo monoclonal (mAb) ou outro ligante para domínios de transposição de membrana e sinalização intracelular (DAI H, et al., 2016).

Para fornecer às células imunes a capacidade de direcionar novos antígenos, as células são projetadas para expressar CARs que basicamente ligam dois domínios funcionais, um extracelular de reconhecimento de antígeno e um estimulador intracelular (LANITIS E, et al., 2012). Para eliminar as células tumorais, os CARs introduzidos em células imunes produzem respostas efetoras que induzem a lise e apoptose de células oncogênicas. Esse mecanismo ativa células CAR levando a liberação de citocinas, proliferação e lise antígeno específica de células tumorais (KARISSON H, et al., 2015).

Entre os linfócitos T, as células *Natural Killer* (NK), também são conhecidas por serem altamente citotóxicas (ZABEL M, et al., 2019). A sinalização de CAR precisa ser adaptada ao tipo de célula utilizada, foi observado que células NK exibem maior citotoxicidade ao expressar um CAR com DAP12 em comparação a células T que expressam CD3 ζ (Complexo protéico de diferenciação 3 zeta) contendo CAR. Os domínios coestimulatórios mais frequentes empregados nos CARs são o CD28 e 4-1BB (PARK CH, 2021).

A imunoterapia celular baseada em CAR foi inicialmente testada em pacientes com neoplasias hematológicas, e o CD19 foi selecionado como antígeno alvo preferencial, com base na sua expressão

seletiva nos linfócitos B. As células CD19-CAR-T são os primeiros produtos da terapia celular para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda de células B recidivantes ou refratárias que foram aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA em 2017. Desde então, o CD19-CAR-T trouxe revolução no campo da imunoterapia devido ao alto potencial de remissão completa em várias malignidades relacionadas ao câncer (TAO L, et al., 2020).

As células T modificadas com um fragmento variável de cadeia única (scFv), reconhecem o antígeno tumoral, CAR de primeira geração consiste em scFv fundido com um domínio transmembranar e uma unidade de sinalização cadeia zeta CD3, que permite reconhecimento de epítomos e ativação de células T sem dependência de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (MAUS MV, et al., 2014). Apesar de ser um candidato antitumoral promissor, o CAR-T ainda apresenta limitações, como no tratamento de tumores sólidos. É difícil para os CAR-T migrarem e se infiltrarem adequadamente em locais de tumores sólidos devido às incompatibilidades de quimiocinas entre CAR-T e células tumorais, presença de componentes anormais vasculares e estromais no microambiente tumoral (GUO F e CUI J, 2021).

As abordagens mais recentes incluem um mecanismo baseado em caspase para eliminar as células CAR-T sob demanda, expressão e secreção de citocinas ativadoras de células T, incorporação de receptores CCR2 para recrutamento de macrófagos no microambiente tumoral ou o uso de células T específicas anti-vírus que reconhecem antígenos virais podendo ser usados como vacinas para aumentar a persistência do CAR-T (STROHL WR e NASO M, 2019). A sinapse imunológica por células TCD4+ virgens interagindo com células apresentadoras de antígenos (APC) é um mecanismo de reconhecimento de sinapse por antígeno. As células CD8+ e NK também podem formar uma sinapse citolítica levando a apoptose, que é a base sobre a qual se baseiam as terapias com células T e NK (STINCHOMBE JC, et al., 2006).

Sendo assim, a imunoterapia consiste em abordagens tecnológicas que utilizam componentes do sistema imunológico no tratamento de doenças neoplásicas, inflamatórias e imunomediadas. Diante do exposto, o artigo teve como objetivo elucidar quais biomoléculas são eficazes para depleção de células cancerosas, quais CAR-T estão sendo testados no cenário atual e que moléculas e células podem ser utilizadas como terapias adjuvantes para potencializar a apoptose em células cancerosas.

MÉTODOS

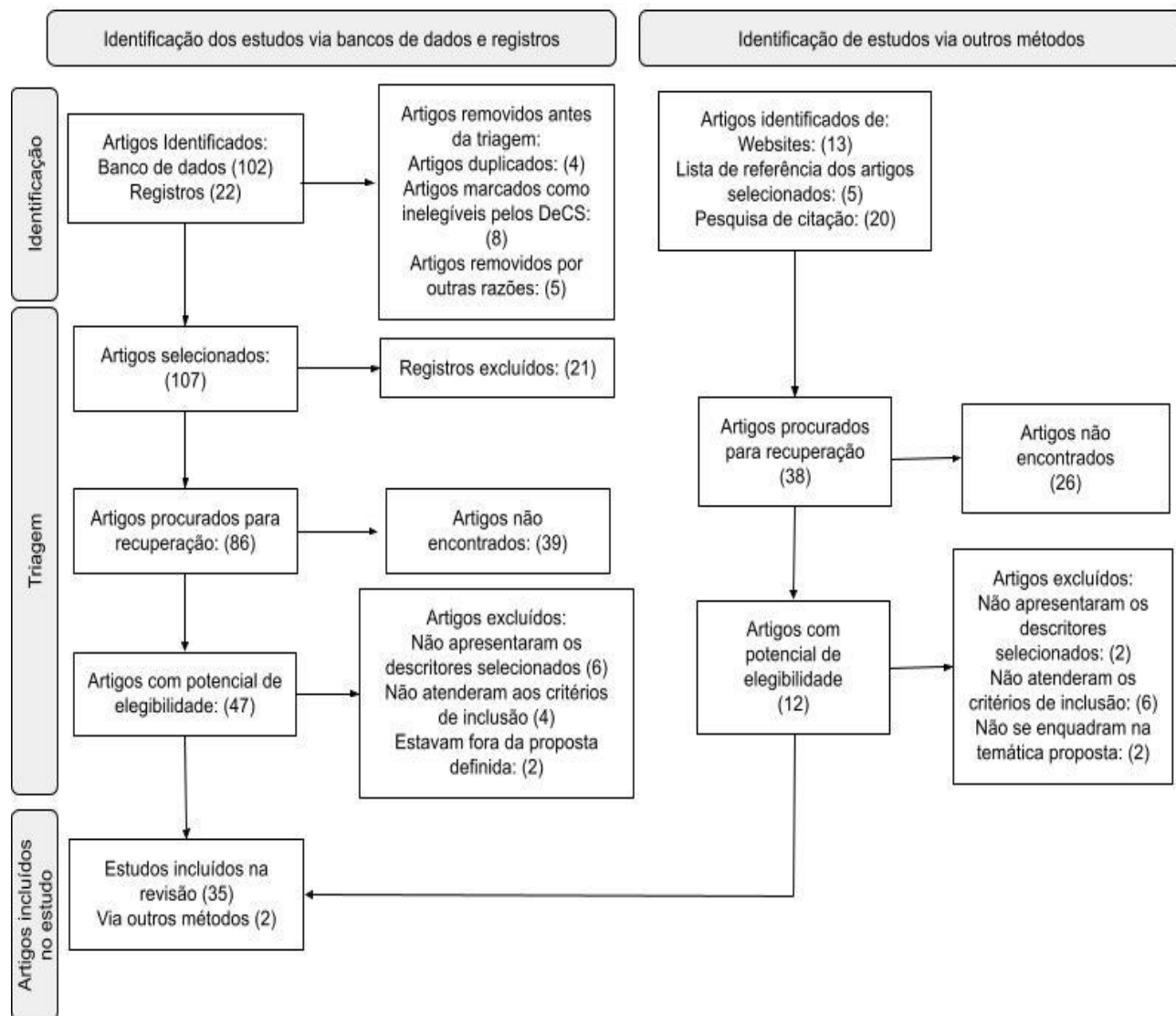
A pesquisa caracteriza-se como uma revisão integrativa da literatura com análise sistemática, onde foram consultadas as bases de dados Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI), Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Scientific Electronic Library (SciELO), Periódicos Capes e Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS). Os descritores utilizados foram padronizados de acordo com os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS): Imunoterapia adotiva, Terapia CAR com células T, mAbs antineoplásicos e Inibidores de checkpoint imunológico.

O levantamento bibliográfico para a análise do material ocorreu de janeiro a fevereiro de 2022, sendo escolhidos artigos em português, inglês e espanhol. 124 artigos foram selecionados e como critérios de inclusão foram incluídos artigos do ano de 2004 à 2022 de pesquisas em ensaios controlados e randomizados, estudos experimentais em fase I e II, artigos de revisão, trabalhos originais recentes que já possuíam aprovação da comunidade científica e para análise dos dados foram seguidas as orientações do relatório preferido para Revisões Sistemáticas e Meta-Análises (PRISMA).

Na primeira pesquisa as informações extraídas de cada artigo foram: título, resumo, ano, metodologia, resultados e conclusão. Foram considerados para compor a sessão dos resultados deste trabalho estudos de revisão (n=12), pesquisas experimentais de fase I e II (n=3) e na discussão (n=22). Os achados avaliaram as principais imunoterapias em uso ou em fase experimental. Dos 124, somente 35 foram incluídos na pesquisa de acordo com os critérios descritos.

Na segunda pesquisa os filtros de texto disponíveis na íntegra, utilizaram como assunto principal: Imunoterapia com células NK, Células NK anticâncer, neoantígenos direcionados e células NK em imunoterapias. Em ambas as pesquisas foram excluídos estudos de caso, relatórios técnicos, capítulos de livro e relatos de experiência (**Figura 1**).

Figura 1 - Fluxograma do processo de seleção dos artigos nas bases de dados consultadas.



Fonte: Padilha MDM, et al., 2022.

RESULTADOS

Davda J, et al. (2019) descreveram achados de vários estudos que apresentaram imunogenicidade avaliados em populações heterogêneas de pacientes e os efeitos potenciais de agentes imunomoduladores e anticorpos antidrogas na segurança, farmacocinética, farmacodinâmica e consequentemente eficácia geral. Du X, et al. (2018) em seu estudo experimental em camundongos comprovou que o uso de ipilimumab e L3D10 quando comparados no mesmo modelo os dois mAbs causaram a rejeição do tumor. Os camundongos machos também apresentaram resultados substanciais e estatisticamente significativos.

Sivori S, et al. (2019) elucidaram os mecanismos ativadores de receptores de células NK mediante interação com seus ligantes específicos PD1-NK e identificou LAG-3, TIM3, TIGIT, HLA-E e HLA-G como checkpoints inibitórios promissores, sendo CAR-T ou CAR-NK direcionados ao HLA-G como abordagem para terapia adotiva de diferentes tumores. Melero I, et al. (2021) delinearam os receptores agonistas de reconhecimento PRRs, PAMPs, TLRs, RIG-I e administração local de citocinas como alvos moleculares para terapia combinada avaliando a eficácia dessas terapias em câncer em estágios iniciais.

Nos achados de Harrington K, et al. (2019) foram identificados os mecanismos de entrada na célula, alteração genética de glicoproteínas do envelope viral e modificação genética para exibir novos sítios de

ligação na superfície de vírus oncolíticos aumentando a especificidade para células tumorais. A modulação da tradução de proteínas virais em células tumorais pode ser alcançada modificando 5'UTR de genes virais com estruturas secundárias que impedem sua tradução ou pela inserção de sequências alvos de microRNAs que são robustamente expressos em células normais mas regulados negativamente em células tumorais. No entanto, o cenário para viroterapia em vírus oncolíticos ainda está em estágios iniciais.

Hu Y, et al. (2017) definiram quais estruturas eram potencialmente adequadas para ativar CAR-NK, como construtos CAR que contém CD3 ζ para domínios de sinalização intracelular como CD28, 4-1BB, DAP12/10, NKG2D, NK-92, CD19/7/33. Sacchetti B, et al. (2019) delimitaram a heterogeneidade e o fenótipo das células transformadas, análise da clonalidade de RCT pré e pós anti-EGFRvIII infusão de células T, revelando intenso recrutamento de linfócitos T endógenos não modificados por produção de quimiocinas, indicando uma boa ativação do sistema imune em resposta ao aumento de neoantígenos.

Qu Q, et al. (2020) em seu estudo experimental identificaram que a expressão IL36 potencializou as células efectoras Th1, CD8+, NK e T quando superexpressas em tecidos tumorais, a administração de mAbs CTLA-4 dias após a implantação subcutânea de células IL36-B16 produziu eficácia antitumoral com redução de taxas de crescimento e sobrevivência prolongada. Outro fator analisado nesse estudo por citometria de fluxo foi que as combinações de IL36 e mAbs CTLA-4 resultaram em aumentos eficazes em CD45+. Apesar dos aumentos no infiltrado de tumor CD45+, a porcentagem de CD4+ e CD8+ não foram alteradas por IL36 e CTLA-4. Os dados sugerem que mAbs IL36 e CTLA-4 potencializam aditivamente a inflamação tumoral.

Zeng J, et al. (2013) em pesquisa experimental utilizaram camundongos que receberam radioterapia que abrigaram números reduzidos de células Tregs em comparação aos não irradiados, houve aumento significativo na proporção de células T citotóxicas para Treg em camundongos recebendo terapia de combinação. Os resultados sugerem que a radiocirurgia associada ao bloqueio de PD1 gera atividade antitumoral robusta contra gliomas intracranianos primários.

Padilha MDM, et al. (2021) elucidaram por estudo teórico possíveis inibidores do vírus Epstein-Barr utilizando o potencial de antígenos direcionados para apresentação cruzada e resposta imune específica de CDs (células dendríticas) em diferentes combinações, consistindo em componentes que envolvem respostas inatas e adaptativas, checkpoint escolhido ou adjuvante, citocinas e anticorpos específicos para o tumor. Sabado RL e Bhardwaj N (2010) determinaram que CDs maduras tem expressão aumentada de moléculas coestimuladoras e aumento da produção de citocinas importantes para ativação e de células T. Um coquetel padronizado de citocinas pró-inflamatórias consistindo de TNF α , IL-1b, IL-6 e PGE2, promovem uma maturação mais uniforme de monócitos derivados de CDs após 2 dias de cultura sendo mais compatível para aplicações clínicas.

Biernacki MA e Bleakley M (2020) abordaram aspectos sobre mutanomas que fornecem uma rica fonte de sequências de aminoácidos aberrantes específicas do câncer que podem ser destrinchadas por algoritmos de previsão de ligação HLA (antígeno leucocitário humano) para identificar candidatos neoantígenos. As principais características de neoantígenos postuladas incluem clonalidade, dissimilaridade para autoantígenos, semelhança com antígenos microbianos, alta expressão de proteína e ligação ao HLA.

Gupta RG, et al. (2021) analisaram abordagens emergentes para neoantígenos personalizados usando vacinas polivalentes contra o câncer e terapia gênica do RCT. A enorme diversidade de peptídeos exibidos pelas MHCII complementa a imensa diversidade de RCT gerada pela recombinação gênica em linfócitos CD4+ e CD8+. Essas estruturas em conjunto dotam o sistema imunológico com capacidade de imunovigilância e de responder a uma variedade de patógenos e mutações associadas a tumores.

Nicholson SE, et al. (2017) analisaram os perfis de citocinas por células NK e funções líticas mediadas via granzima B e perforina, além de células NK possuem capacidade regulatória de CDs por citocinas e outros fatores de crescimento, a transferência de células NK autólogas e alogênicas em ensaios clínicos mostrou-se segura. Lee H, et al. (2021) identificaram que os perfis de quimiocinas em particular CX3CL1, recruta CXCR3 expressando células CD56dim NK que é um fator prognóstico positivo para sobrevivência do paciente e infiltração de células NK em cinco malignidade diferentes (**Quadro 1**).

Quadro 1 - Síntese dos principais achados relacionados a imunomodulação com terapias CAR-T, mAbs, CTLA-4 e neoantígenos na pesquisa.

N	Autores (Ano)	Título	Objetivo	Conclusão	Contribuição
1	DAVDA J, et al. (2019)	Immunogenicity of immunomodulatory, antibody-based, Oncology therapeutics.	Descrever os mecanismos de ação de agentes imunomoduladores contra câncer.	A disponibilidade de vários agentes imunomoduladores comparáveis pode fornecer modalidades alternativas para tratamento personalizado de câncer.	Estudo de revisão onde elucidaram os mecanismos imunomoduladores baseados em anticorpos aprovados, anti-drogas e relevância clínica em pacientes com câncer.
2	DU X, et al. (2018)	Uncoupling therapeutic from immunotherapy-related adverse effects for safer and effective anti-CTLA-4 antibodies in <i>CTLA4</i> humanized mice.	Avaliar os efeitos adversos do gene CTLA-4 de mAbs em camundongos modelos humanizados.	O engajamento bialélico do gene CTLA-4 era necessário para prevenir a conversão de células T autorreativas em Treg, fornecendo uma imunoterapia mais segura e potencialmente eficaz direcionada a CTLA-4.	Pesquisa experimental em camundongos homo/heterozigotos para o alelo humano, descobriram que eventos adversos exigiam engajamento bialélico e imunoterapêutico monoalélico, a humanização L3D10, aumentou ainda mais a segurança sem afetar o efeito terapêutico.
3	SIVORI S, et al. (2019)	Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications.	Delinear os vários receptores NK, checkpoints inibitórios recentemente identificados e implicações na imunoterapia de tumores.	O maior sucesso terapêutico do TCTH haploidênticos é principalmente relacionado com células NK para terapia tanto de malignidades hematológicas quanto tumores sólidos, os CAR-NK podem substituir ou complementar CAR-T vista a potente atividade citolítica.	Estudo de revisão onde demonstraram que tais receptores inibitórios, particularmente NKG2A, também podem ser expressos em CTLs seguindo proliferação ou exposição induzida por antígeno ou citocina a TGF β , esses achados mostram a eficácia do bloqueio de NKG2A na terapia do tumor.
4	MELERO I, et al. (2021)	Intratumoral administration and tumor tissue targeting of cancer immunotherapies	Discutir as abordagens no cenário atual de doenças tumorais e imunoterapias direcionadas.	Imunoterapias direcionadas aos tecidos serão de valor específico para cânceres localizados e devem mudar os resultados e perfil citotóxico de imunoterapias, em particular implantando terapia adjuvante.	Artigo de revisão onde os achados mostraram que a administração direta oferece um meio de maximizar o índice terapêutico, o princípio para estimulação imunológica é utilizar o tumor como uma vacina e potencializar uma resposta antitumoral pré-existente.
5	HARRINGTON K, et al. (2019)	Optimization oncolytic virotherapy in cancer treatment	Elucidar abordagens para o desenvolvimento terapêutico da viroterapia.	Aplicação de combinações de vírus oncolíticos com inibidores de checkpoint está em estágios iniciais, entretanto há muitas estratégias terapêuticas em desenvolvimento que podem melhorar os resultados relacionados ao câncer.	Pesquisa teórica de revisão onde foi comparado as correntes modalidades e futuras para reconhecimento e melhora na aceitação do tumor por vírus oncolíticos e avaliação de métodos para sua atividade biológica.
6	HU Y, et al. (2017)	Chimeric antigen receptor (CAR)-transduced natural killer cells in tumor immunotherapy	Discutir a imunoterapia baseada em células CAR e NKR-NK como novas estratégias para imunoterapia.	As células NK expressam uma variedade de receptores que reconhecem células tumorais, as células NK transduzidas por CAR (NKR) apresentam várias vantagens e segurança no uso clínico.	Pesquisa de revisão da literatura onde os aspectos elucidados analisaram mecanismo efetor de células NK, viabilidade para uso clínico, reconhecimento antigênico em cânceres hematológicos e tumores sólidos em ensaios clínicos e pré-clínicos.
7	SACCHETTI B, et al. (2019)	CAR-T with License to Kill Solid Tumors in Search of a Winning Strategy	Identificar estratégias ainda em falta para combater cânceres.	Apenas alguns estudos forneceram um entendimento impactante na prática clínica, a terapia adotiva CAR-T está apenas no início tendo uma perspectiva multidisciplinar para imunoterapias.	Artigo de revisão em que os autores identificaram efeitos a viabilidade, força e duração de sinais entregues por células T específicas de tumor, e identificaram as potencialidades de terapias em cânceres.

N	Autores (Ano)	Título	Objetivo	Conclusão	Contribuição
8	Qu Q, et al. (2020)	IL36 Cooperates With Anti-CTLA-4 mAbs to Facilitate Antitumor Immune Responses	Obter uma compreensão adicional da resposta imune IL36 antitumoral concentrando seus efeitos em Treg.	A combinação de mAbs CTLA-4 e IL36 levou a um aumento na proliferação e produção de IFN- γ por CD4+ e CD8+ comparado a terapia única.	Pesquisa experimental que elucidou os mecanismos celulares da IL36 com nova combinação para imunoterapia.
9	Zeng J, et al. (2013)	Anti-PD1 blockade and stereotactic radiation produce long-term survival in mice with intracranial gliomas	Testar a combinação anti-PD1 com radiocirurgia estereotáxica em um modelo de glioblastoma multiforme ortotópico de camundongo.	A combinação de bloqueio anti-PD1 e radioterapia localizada resulta em sobrevida a longo prazo em camundongos com tumores cerebrais ortotópicos.	Estudo experimental onde a sobrevida melhorada foi demonstrada com a terapia combinada anti-PD1 mais radiação em comparação com qualquer modalidade sozinha.
10	PADILHA MDM, et al. (2021)	Inibidores de EBNA1 como alvos para terapias associadas à oncogênese do herpesvírus humano 4	Avaliar quais moléculas possuem potencial terapêutico na oncogênese de EBV.	As pesquisas no uso de inibidores EBNA1 e EBV apresentaram resultados promissores onde as células expostas a infecção sofreram perda de replicação e depleção de genomas EBV.	Pesquisa de revisão sistemática descritiva onde o autor delimitou aspectos moleculares relacionados a infecção HHV-4, drogas anti-EBV e imunoterapias com adjuvantes em estudos experimentais.
11	SABADO RL e BHARDWAJ N, 2010	Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment	Determinar o papel significativo de CDs na geração global de respostas imunes contra antígenos.	Vacinas com CDs provavelmente aumentarão a imunogenicidade e eficácia <i>in vivo</i> , duráveis e antitumorais em uma população maior de pacientes.	Artigo de revisão que aborda estudos clínicos <i>ex vivo</i> , uso de vacinas para CDs e estratégias com combinação de CDs <i>in vivo</i> .
12	BIERNACKI MA e BLEAKLEY M, 2020	Neoantigens in Hematologic Malignancies	Elucidar os avanços na descoberta de neoantígenos e discutir o potencial desses neoantígenos para tradução clínica.	A eficácia de vacinas de neoantígenos e transferência adotiva de células T-neoantígenos específicas indica que os neoantígenos são válidos alvos terapêuticos.	Um estudo de revisão onde os autores definiram os principais aspectos terapêuticos de neoantígenos em combinação com imunoterapias de células T.
13	GUPTA RG, et al. (2021)	Exploiting Tumor Neoantigens To Target Cancer Evolution: Current Challenges and Promising Therapeutic Approaches	Analisar abordagens para identificar, priorizar e direcionar neoantígenos personalizados.	A manipulação imunoterapêutica de neoantígenos oferece abordagem atraente para atingir o fenótipo da plasticidade do câncer e anular a evolução clonal.	Artigo de revisão que delineou as evidências e abordagens recentes de neoantígenos direcionados para imunoterapia do câncer.
14	NICHOLSON SE, et al. (2017)	Natural Killer cell anti-tumor immunity	Discutir a função do supressor de proteínas de citocinas (SOCS) na regulação negativa de IL15, células NK e o direcionamento desses reguladores intracelulares como novos checkpoints.	Os estudos destacados sugerem que a inibição de CIS e SOCS2 poderia ser uma modalidade de tratamento útil no câncer, seja em malignidades hematológicas ou no contexto de melhorar a vigilância imunológica pós-cirurgia.	Artigo de revisão onde foi analisado o papel das células linfóides inatas, sua contribuição para imunidade tumoral e a ativação de células NK por IL-15 para seu desenvolvimento e atividade efetora.
15	LEE H, et al. (2021)	Targeting NK Cells to Enhance Melanoma Response to Immunotherapies	Elucidar a importância das células NK na mediação de uma resposta imune anticancerígena no contexto do melanoma e oportunidades para superar no contexto do melanoma.	Em malignidades, as células NK podem desempenhar um papel crítico na coordenação eficiente do processo adaptativo do sistema imunológico.	Pesquisa de revisão em que o autor identificou a cascata de citocinas e resposta imune robusta pelas células NK através da secreção de perforina e granzima B para explicar os efeitos de células NK em imunoterapias futuras.

Fonte: Padilha MDM, et al., 2022.

DISCUSSÃO

Imunomodulação e Imunogenicidade do Checkpoint Imunológico

Os agentes imunomoduladores potencializam respostas imunes por meio de imunomodulação direta anti-CTLA-4 ou mAbs anti-PD1/PDL1, como no caso de anticorpos pró-apoptóticos depletórios que visam células imunes como anti-CD19 ou anticorpos anti-CD20 (DAVDA J, et al., 2019). Em tecidos linfóides, a ativação de células T desencadeia expressão do checkpoint imune CTLA-4, a inibição de CTLA-4 pelo ipilimumabe pode resultar em coestimulação e respostas efetoras de células T contribuindo para efeitos antitumorais mais eficazes (WEI SC, et al., 2018).

A expressão de PD1 por linfócitos infiltrantes de tumor está associada a função prejudicada e diminuição da sobrevida, proliferação, liberação de citocinas e citotoxicidade contra células tumorais. A inibição dessa via supressora associada ao tumor por agentes direcionados ao PD1 ou PDL1 demonstrou restaurar os efeitos das respostas antitumorais em pacientes tratados (BAKSH K e WEBER J, 2015). A superexpressão de PD1 em células tumorais é um mecanismo de resistência adaptativa para facilitar a sobrevivência do tumor e evasão imune do câncer através da inibição do mecanismo efetor de células TCD8+. Estudos recentes mostraram que a expressão elevada de PD1 em tumores se correlaciona com uma melhor taxa de resposta, progressão na sobrevida e sobrevivência global a terapia dirigida por anti-PD1 em melanoma e outros tipos de câncer (KNOX T, et al., 2019).

mAbs demonstraram efeitos imunoterapêuticos no câncer em modelos de camundongos e pacientes com melanoma. Em combinação mAbs anti-PD1, nivolumabe e o mAb anti-CTLA-4 Ipilimumabe, aumentam significativamente a taxa de resposta imunológica em pacientes com melanoma avançado (DU X, et al., 2018). As células NK desempenham papéis importantes nas defesas inatas contra infecções virais, crescimento tumoral e disseminação metastática. Durante a progressão do câncer, células transformadas diminuem ou até perdem a expressão de HLA-I em sua superfície. Os receptores NK geralmente estão ausentes ou expressos em pequenas quantidades em células normais enquanto que são regulados positivamente na superfície de células estressadas ou tumorais (SIVORI S, et al., 2019).

Agentes de imunoterapia ativos podem ser quimerizados em moléculas que se ligam com alta afinidade para porções restritas ou enriquecidas em células tumorais, células estromais ou na matriz extracelular de tecidos malignos. Combinando esta abordagem com a apresentação tumoral é possível aumentar concentrações bioativas (MELERO I, et al., 2021). Microvesículas ou nanovesículas a base de lipídeos são abordagens promissoras para melhorar a biodisponibilidade intratumoral através da liberação lenta de imunoterapias. Formas inativas de vários compostos poderiam ser geradas como pró-drogas que se tornariam seletivamente ativadas após atingir tecidos malignos por via de biodistribuição sistêmica (HARRINGTON K, et al., 2019).

Terapias com CAR-T

A ativação de células T é um processo complexo. O receptor de antígeno quimérico (CAR) é uma proteína de fusão modificada que consiste em um domínio de antígeno de reconhecimento extracelular fundido a um domínio de sinalização intracelular. As células T geneticamente modificadas com o CAR demonstram notável sucesso no tratamento de cânceres hematológicos. Em comparação com as células T, as células NK transduzidas por CAR apresentam várias vantagens, como a segurança no uso clínico, os mecanismos pelos quais reconhecem as células cancerígenas e sua abundância em amostras clínicas (HU Y, et al., 2017).

Para a produção de células CAR, geralmente são coletadas células mononucleares de sangue periférico que se expandem na presença de estímulos de anticorpos anti-CD3, interleucinas ou células. São então introduzidos em seu genoma por eletroporação ou transdução viral tornando as células ainda mais expandidas. Uma vez um número adequado de células é obtido e as células são reinfundidas no paciente (SILVA DE e RAMOS CA, 2018). Receptores projetados para terapias com CAR adotiva precisam otimizar funções duplas, como reconhecimento de antígeno e habilidade para desencadear a maquinaria lítica de linfócitos T efetores reprogramados. Dessa forma, as células CAR-T expressam seu impacto citotóxico nas células cancerígenas, contornando a limitação de reconhecimento de antígeno restrito a HLA (SACCHETTI B, et al., 2019).

mAbs anti-CTLA-4

Qu Q, et al. (2020) demonstraram experimentalmente que as citocinas desempenham um papel fundamental na imunoterapia antitumoral, além das células TCD4+ e TCD8+ convencionais, a IL-36 aumenta a proliferação de células T reguladoras (Treg) *in vivo* e *in vitro*. A combinação com mAbs CTLA-4 e IL-36 induziu aumento na produção e proliferação de IFN γ em linfócitos CD4+ e CD8+ quando comparado a terapia única com mAbs CTLA-4. Esses achados elucidam possíveis terapias combinadas para melhora na taxa de resposta clínica e redução da metástase pulmonar e do câncer de mama.

Zeng J, et al. (2013) em um modelo experimental de glioma murino comprovaram que o bloqueio de mAb-PD1 combinado e o bloqueio de mAb anti-CTLA-4 apresentou sobrevida de 80% em camundongos. A inibição do CTLA-4 resultou em sobrevida aumentada, melhora imune antitumoral, implicando assim o ligante CTLA-4 como alvo de vacinas tumorais adjuvantes existentes. Dada a potente capacidade de bloqueio CTLA-4 combinado com Ipilimumab e anti-PD1 nivolumab, estudos em fase II para tratamento de glioblastoma maligno estão em andamento (GEDEON PC, et al., 2014).

Células dendríticas direcionadas experimentalmente *in vivo* e neoantígenos

Métodos *in vivo* de apresentação de antígenos cancerígenos as células CD são baseados na maquinaria de receptor. As CDs reconhecem diferentes sinais associados a processos patológicos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Existem diferentes receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) na superfície de CDs, como TLRs (Receptor Toll Like), NOD, de lectina tipo C (CLRs), RIG-I, MDA-5 e outros. Essas moléculas, desencadeiam a maturação de CDs e secreção de citocinas pró-inflamatórias se ligadas a PAMP ou DAMP, essa sensibilidade de sinais emitidos poderia ser utilizada para aumentar a resposta imune regulada, os ligantes PRRs das CDs podem servir como adjuvantes na composição de vacinas anti-câncer de CDs (PADILHA MDM, et al., 2021).

CDs carregam antígenos através de fagocitose, macropinocitose ou endocitose usando receptores Fc- γ tipo I-II, integrinas α V β 3 ou α V β 5, lectinas tipo C e receptores scavenger. Após a captação, as CDs processam antígenos protéicos em peptídeos que são apresentados a moléculas MHC para apresentação aos linfócitos T (SABADO RL e BHARDWAJ N, 2010). A maturação é induzida por estímulos exógenos que são produtos microbianos sendo mediados através TLRs ou membros do inflamassoma e endógenos são as citocinas TNF α , IL-1, IL-6 e IFN α , produzidas pelas células do sistema imunológico. É também acompanhada pelo aumento da expressão de receptores de quimiocinas, adesão de moléculas coestimuladoras envolvidas na migração de CDs para tecidos linfóides e são necessários para ativação, proliferação e diferenciação de linfócitos B e T (AKIRA S e TAKEDA K, 2004; KATO H, et al., 2006; PEDRA JHF, et al., 2009; SKOBERNE M, et al., 2004; MARTÍN-FONTECHA A, et al., 2009).

No tratamento de tumores sólidos, sucessos clínicos foram observados com a transferência adotiva de linfócitos infiltrantes tumorais (TILs) específicos de neoantígeno e vacinas de neoantígenos, destacando a importância dessa classe de antígeno na imunidade antitumoral. As respostas das células T contra os neoantígenos também parecem contribuir para a eficácia do *checkpoint* imunológico com transplante alogênico de células hematopoiéticas (BIERNACKI MA e BLEAKLEY M, 2020).

As células T podem ser isoladas do sangue periférico do paciente, TIL ou MILs (Infiltrado de linfócitos em malignidades hematológicas) então expandidos *ex vivo* não especificamente ou contra um antígeno definido e reinfundido. As células T podem ser manipuladas para expressar um receptor transgênico específico de neoantígeno, permitindo a infusão de um produto gerado com especificidade e composições definidas (GUPTA RG, et al., 2021).

Células NK e potencial citotóxico

A transferência adotiva de células NK autólogas e alogênicas tem sido testadas em ensaios clínicos e se mostraram seguras, a atividade de células NK inclui sua engenharia para expressar receptores de ativação e CAR que expressam antígenos tumorais ou ligantes de ativação. Estratégias recentes incluem a geração de células NK derivadas do sangue de cordão umbilical que expressam CAR-CD19 para linfoma de células B, IL-15, CD16 e uma caspase 9 induzível; está última para que as células possam ser destruídas farmacologicamente após transfusão (NICHOLSON SE, et al., 2017).

As células NK são potentes produtoras de citocinas pró-inflamatórias e também capazes de provocar fortes respostas antitumorais através da secreção de perforina e granzima B. Os perfis de receptores de quimiocinas, CD56bright e CD56dim expressam diferentes quimiocinas e o perfil de expressão contribui para o seu fenótipo. A citotoxicidade é iniciada pelo acúmulo de sinais de ativação que superam os sinais inibitórios, dando início a secreção de perforina que forma poros na membrana da célula alvo, o que permite a entrada de granzima B na célula levando a apoptose por ativação da caspase (LEE H, et al., 2021).

A vasta gama de receptores ativadores e inibitórios equipam células NKs com alta especificidade de alvos, a transferência de células NK com células tronco hematopoiéticas não mostra efeitos adversos, e sim potencial resposta a terapia em pacientes idosos com leucemia mieloide aguda. Aplicação combinada de células NK com mAbs fornece uma nova direção de imunoterapia. Em um estudo de fase I, células NK autólogas ativadas foram infundidas em pacientes com tumor sólido HER2-positivo submetidos a trastuzumab e demonstraram fenótipo anti-tumoral preliminar (WU SY, et al., 2020).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de imunoterapias CAR-T com adjuvantes ou combinadas demonstrou contribuir com a imunomodulação de pacientes oncológicos, mAbs em combinação ao CTLA-4 potencializam efeito clínico e duradouro com melhores taxas de sobrevida, sendo observado mesmo em casos refratários ao tumor convencional. CDs direcionadas possuem alta capacidade de apresentação cruzada de antígenos à linfócitos CD4+ e CD8+ para indução de apoptose, possuindo menos efeitos adversos em estudos experimentais. Os neoantígenos são alvos em fase teste, entretanto já demonstraram potencial terapêutico em estudos com vacinas para neoantígenos de câncer, desse modo essas metodologias permitem aumento na sobrevida e inibição de células cancerosas levando a um mecanismo capaz de suprimir o câncer.

REFERÊNCIAS

1. AKIRA S, TAKEDA K. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*. 2004; 4(7): 499-511.
2. BAKSH K, WEBER J. Immune Checkpoint Protein Inhibition for Cancer: Preclinical Justification for CTLA-4 and PD1 Blockade and new Combinations. *Seminars in Oncology*. 2015; 42(3): 363-377.
3. BIERNACKI MA, BLEAKLEY M. Neoantigens in Hematologic Malignancies. *Frontiers in Immunology*. 2020; 11(121): 1-14.
4. DAI H, et al. Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, 2016; 108(7): 1-14.
5. DAVDA J, et al. Immunogenicity of immunomodulatory, antibody-based, Oncology therapeutics. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 2019; 7(105): 1-9.
6. DU X, et al. Uncoupling therapeutic from immunotherapy-related adverse effects for safer and effective anti-CTLA-4 antibodies in *CTLA4* humanized mice. *Cell Research*. 2018; 28(4): 1-15.
7. GEDEON PC, et al. Antibody-based immunotherapy for malignant glioma. *Semin. Oncol.*, 2014; 41(4): 1-24.
8. GUO F, CUI J. CAR-T in Cancer Treatment: Develop in Self-Optimization, Win-Win in Cooperation. *Cancers*. 2021; 13(8): 1-16.
9. GUPTA RG, et al. Exploiting Tumor Neoantigens To Target Cancer Evolution: Current Challenges and Promising Therapeutic Approaches. *Cancer Discov.*, 2021; 11(5): 1-32
10. HARRINGTON K, et al. Optimization oncolytic virotherapy in cancer treatment. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2019; 18(9): 689-706.
11. HU Y, et al. Chimeric antigen receptor (CAR)-transduced natural killer cells in tumor immunotherapy. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2017; 39(2): 167-176.
12. KARISSON H, et al. Evaluation of Intracellular Signaling Downstream Chimeric Antigen Receptors. *Plos One*. 2015; 10(12): 1-20.
13. KATO H, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*. 2006; 441(7089): 101-105.
14. KNOX T, et al. Selective HDAC6 inhibitors improve anti-PD-1 immune checkpoint blockade therapy by decreasing the anti-inflammatory phenotype of macrophages and down-regulation of immunosuppressive in tumor cells. *Scientific Reports*. 2019; 9(1): 1-17.
15. LANITIS E, et al. Redirected Antitumor Activity of Primary Human Lymphocytes Transduced With a Fully Human Anti-mesothelin Chimeric Receptor. *Molecular Therapy*. 2012; 20(3): 633-643.

16. LEE H, et al. Targeting NK Cells to Enhance Melanoma Response to Immunotherapies. *Cancers*. 2021; 13(6): 1-28
17. MARTÍN-FONTECHA A, et al. Dendritic cell migration to peripheral lymph nodes. *Handb Exp Pharmacol.*, 2009; 188: 31-49.
18. MAUS MV, et al. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood*. 2014; 123(17): 2625-2635.
19. MELERO I, et al. Intratumoral administration and tumor tissue targeting of cancer immunotherapies. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2021; 18(9): 1-19.
20. NICHOLSON SE, et al. Natural Killer cell anti-tumor immunity. *Molecular Immunology*. 2017; 110: 40-47.
21. PADILHA MDM, et al. Inibidores de EBNA1 como alvos para terapias associadas a oncogênese do herpesvírus humano 4. *Brazilian Journal of Health Review*. 2021; 4(5): 20685-20703.
22. PARK CH. Making Potent CAR T Cells Using Genetic Engineering and Synergistic Agents. *Cancers*. 2021; 13(13): 1-30.
23. PEDRA JHF, et al. Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome. *Curr Opin Immunol.*, 2009; 21(1): 10-16.
24. QU Q, et al. IL36 Cooperates With Anti-CTLA-4 mAbs to Facilitate Antitumor Immune Responses. *Frontiers in Immunology*. 2020; 11(34): 1-11.
25. SABADO RL, BHARDWAJ N. Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment. *Immunotherapy*. 2010; 2(1): 1-29.
26. SACCHETTI, et al. CAR-T with License to Kill Solid Tumors in Search of a Winning Strategy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(8): 1-15.
27. SILVA DJ, RAMOS CA. Cancer immunotherapy using CAR-T cell: from the research bench to the assembly line. *Biotechnol J.*, 2018; 13(2): 1-16.
28. SIVORI S, et al. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cellular & Molecular Immunology*. 2019; 16(5): 430-441.
29. SKOBERNE M, et al. Danger signals: a time and space continuum. *Trends in Molecular Medicine*. 2004; 10(6): 251-257.
30. STINCHCOMBE JC, et al. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature*. 2006; 443(7110): 462-465.
31. STROHL WR, NASO M. Bispecific T-Cell Redirection versus Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T Cells as Approaches to Kill Cancer Cell. *Antibodies*. 2019; 8(41): 1-68.
32. TAO L, et al. CD19-CAR-T Cells Bearing a KIR/PD-1-Based Inhibitory CAR Eradicate CD19+HLA-C1 Malignant B Cells While Sparing CD19+HLA-C1+ Healthy B Cells. *Cancers*. 2020; 12(9): 1-17.
33. TEIXEIRA HC, et al. Proteínas de Checkpoint Imunológico como novo alvo da imunoterapia contra o câncer: revisão da literatura. *HU Revista*. 2019; 45(3): 325-333.
34. WEI SC, et al. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discovery*. 2018; 8(9): 1069-1086.
35. WU SY, et al. Natural Killer cells in cancer biology and therapy. *Molecular Cancer*. 2020; 19(1): 1-26.
36. ZABEL M, et al. The making and function of CAR cell. *Immunol Lett.*, 2019; 212: 1-41.
37. ZENG J, et al. Anti-PD1 blockade and stereotactic radiation produce long-term survival in mice with intracranial gliomas. *International Journal of radiation oncology biology, physics*. 2013; 86(2): 1-14.