

Henrique Couto Teixeira¹
Lavínia da Silva Dias¹
Tauane Larissa Menão¹
Erick Esteves de Oliveira¹

¹ Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil.

RESUMO

Uma nova era no tratamento do câncer está surgindo com o uso de anticorpos capazes de inibir pontos de bloqueio do sistema imunológico, chamados de “inibidores de checkpoint”. Um novo conceito de “balas mágicas”, que no início do século passado foram imaginadas por Paul Ehrlich como capazes de atuar diretamente na destruição de alvos tumorais, é representado agora por anticorpos direcionadas contra moléculas que bloqueiam a atividade antitumoral do sistema imunológico, como o antígeno-4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4) e a proteína-1 de morte celular programada (PD-1). Essas novas imunoterapias vêm revolucionando a forma de tratar diferentes tipos de câncer. Nesta revisão selecionamos estudos sobre CTLA-4 e PD-1, seus ligantes em células apresentadoras de antígenos, assim como destacamos a importância da descoberta de antígenos tumorais e o papel do sistema imunológico na imunovigilância tumoral. Nesse estudo são discutidos aspectos relacionados aos efeitos de imunoterapias baseadas no uso de anticorpos monoclonais anti-CTLA-4 e anti-PD-1/ PD-L1, como o risco de serem estimuladas respostas direcionadas a tecidos saudáveis e outros efeitos adversos, bem como o uso de terapias combinadas que podem contribuir para melhorar a eficiência do tratamento do câncer.

Palavras-chaves: Anticorpos; Câncer; Imunoterapia; Linfócitos T; Imunomodulação.

ABSTRACT

A new era in cancer treatment is emerging with the use of antibodies directed against immune checkpoint proteins, known as “checkpoint inhibitors”. A novel concept of “magic bullets”, conceived by Paul Ehrlich at the beginning of the last century, as being capable of acting directly on the destruction of tumor targets, is now represented by antibodies directed against molecules which block the antitumor activity of the immune system, such as Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 (CTLA-4) and Programmed Cell Death Protein-1 (PD-1). These new immunotherapies have revolutionized the treatment of different cancer types. Studies on CTLA-4, PD-1, and their ligands in antigen presenting cells are discussed in this review. The importance of tumor antigen discovery and the role of the immune system in immune surveillance of tumors were highlighted. Also in the present study, aspects related to the effects of immunotherapies based on the use of anti-CTLA-4 and anti-PD-1/ PD-L1 monoclonal antibodies are described, such as the risk of stimulating responses to normal tissues and other adverse effects, as well as the use of combination therapies which can improve the efficacy of cancer treatment.

Key-words: Antibodies; Cancer; Immunotherapy; T-Lymphocytes; Immunomodulation.

✉ **Henrique C. Teixeira**

Centro de Tecnologia Celular e Imunologia Aplicada (IMUNOCET), ICB, UFJF, Juiz de Fora, Minas Gerais
CEP: 36036-900
✉ henrique.teixeira@ufjf.edu.br

Submetido: 22/10/2019

Aceito: 22/10/2019



INTRODUÇÃO

O câncer é o segundo maior responsável por mortes no mundo, tendo levado a óbito 9,6 milhões de pessoas no ano de 2018. Nesse sentido, o desenvolvimento de formas mais eficazes de tratamento é um dos maiores desafios para frear o avanço da doença.¹ Na última década, novas terapias vêm sendo direcionadas para a identificação e reversão de mecanismos de escape tumoral, visando normalizar a capacidade antitumoral do sistema imunológico. Terapias voltadas para a modulação da resposta imune no microambiente tumoral têm apresentado maior eficiência e menores efeitos adversos, em comparação a terapias convencionais voltadas para a estimulação sistêmica de mecanismos de resposta imune.²

Laureados em 2018 com o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia, os pesquisadores James P. Allison e Tasuku Honjo, contribuíram para o estabelecimento de um princípio inteiramente novo para a terapia do câncer. Allison et al³ da Universidade do Texas (EUA), mostraram que o antígeno-4 de linfócito T citotóxico (Cytotoxic T-lymphocyte Antigen-4 / CTLA-4), também denominado CD152, que regula negativamente a ativação de células do sistema imunológico, estava envolvido no crescimento de certos tumores. Foi possível, então, inibir a atividade do CTLA-4, fazendo uso de anticorpos bloqueadores anti-CTLA-4, favorecendo assim o restabelecimento da capacidade de combate ao tumor pelas células do sistema imunológico.³

Em paralelo, o Dr. Honjo e seu grupo da Universidade de Kioto, Japão, demonstraram que outra proteína presente nas células do sistema imunológico, a proteína-1 de morte celular programada (PD-1/programmed cell death protein-1), também atuava, mas apresentava um mecanismo diferente, fazendo bloqueio direto da ativação de linfócitos T, células chave na atividade protetora do sistema imunológico.⁴

A partir desses estudos foram desenvolvidas novas abordagens para o tratamento de pacientes portadores de câncer. Terapias baseadas na inibição do CTLA-4, PD-1 e de ligantes da molécula PD-1, têm se mostrado surpreendentemente eficazes na luta contra o câncer. Essas novas e inspiradoras descobertas se tornaram um novo marco na terapia contra o câncer, abrindo novas perspectivas de pesquisa e caminhos para tratamentos inovadores que estão revolucionando o combate ao câncer.

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo de revisão foi discutir a importância do sistema imune na vigilância contra tumores, bem como os mecanismos imunológicos aplicados no tratamento do câncer, em especial o uso de moléculas inibidoras dos pontos de bloqueio do sistema imunológico, denominados de inibidores de checkpoint.

REVISÃO DE LITERATURA

O sistema imunológico está diretamente envolvido em diversas situações clínicas, incluindo doenças infecciosas, rejeição de transplantes, reações alérgicas, respostas inflamatórias e autoimunes, e, com destaque nos dias atuais, no reconhecimento e eliminação de tumores. O conceito de vigilância e eliminação de tumores primários pelo sistema imune foi inicialmente sugerido por Paul Ehrlich, médico e renomado imunologista alemão, ganhador do Prêmio Nobel de Medicina em 1908, todavia, à época não foi possível testar esta teoria. Com os avanços da imunologia, o conceito de vigilância imunológica foi restabelecido,⁵ sendo sugerido que o sistema imunológico seria capaz de reconhecer proteínas específicas, denominadas de neo-antígenos, expressos em células tumorais, e que esse reconhecimento levaria à eliminação de células tumorais e à manutenção da homeostase tecidual no organismo.^{6,7}

Não obstante, diversos tumores se desenvolvem em indivíduos imunocompetentes, o que desperta um questionamento a respeito do funcionamento e eficiência da imunidade antitumoral, indicando que as células cancerígenas podem, por vezes, escapar da vigilância e do combate executado por respostas imunológicas envolvendo células do sistema imunológico, em especial, escapar dos linfócitos T.⁸

Enquanto que os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos e desenvolvimento de imunidade humoral, diferentes populações de células T atuam como células efetoras e reguladoras da imunidade celular. As células T amadurecem no timo e lá passam a expressar seu receptor para antígeno, denominado receptor da célula T ou TCR (T-cell receptor). No timo, os linfócitos T se diferenciam em duas principais populações: as células T auxiliaadoras ou T helper (Th), também chamadas de células T CD4 positivas, e as células T citotóxicas (Tc) ou células T CD8+. As células T só reconhecem antígenos proteicos apresentados por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC – Major Histocompatibility Complex). Peptídeos processados em fagolisossomos de células dendríticas, macrófagos e linfócitos B são apresentados às células T CD4+ via MHC do tipo II (MHC-II). Já as células T CD8+ reconhecem peptídeos de origem citoplasmática apresentados via MHC-I, em especial, proteínas virais e antígenos tumorais.⁹

A ativação das células T é de fundamental importância na proteção contra agentes infecciosos e tumores. O processo de ativação dos linfócitos T envolve etapas distintas. Inicialmente, é necessário o contato entre células apresentadoras de antígeno (APCs) e os linfócitos T. Para isso, receptores para antígeno (TCR) e moléculas acessórias ou co-estimuladoras, expressos na membrana de células T, interagem com seus ligantes

nas APCs. Essa fase, denominada de fase cognitiva da ativação dos LT, desencadeia sinais para o interior da célula T capazes de estimular a produção de citocinas. Citocinas, como a interleucina-2 (IL-2), são mediadores proteicos envolvidos em diversas respostas imunológicas e inflamatórias, podendo promover a multiplicação celular que leva a expansão de clones de células T efectoras e produção de células de vida longa ou células de memória, gerando imunidade. Curiosamente, a IL-2 está envolvida na ativação de células T reguladoras (Treg) que atuam suprimindo a ativação da resposta imune, favorecendo a volta à homeostase. Isso demonstra que a ativação da resposta imune precisa de controles ou “freios”, pois o excesso de células T ativadas causa um desequilíbrio que precisa ser contido para o retorno à homeostase. Nesse contexto, pontos de bloqueio, denominados como proteínas de “checkpoint” como as moléculas CTLA-4 e PD-1, expressas nas células T ativadas se apresentam como importantes reguladores da ativação dos linfócitos.¹⁰ Ligantes para proteínas de checkpoint podem ser expressos em diferentes células, incluindo as células apresentadoras de antígenos e células tumorais. A expressão de proteínas de checkpoint e seus ligantes nas células tumorais é visto como importante mecanismo de escape, capaz de frear a resposta das células T anti-tumor, favorecendo assim a progressão tumoral.

Antígenos tumorais e seu reconhecimento pelo sistema imune

Apesar da hipótese de que o sistema imune poderia exercer uma ação protetora contra o desenvolvimento de células tumorais ser tão antiga quanto os primórdios da imunologia, foi apenas com a descoberta de antígenos tumorais que esse conceito ganhou força. As primeiras evidências vieram de experimentos mostrando que animais imunizados com certo tipo de tumor induzido quimicamente, se tornavam capazes de destruir esse mesmo tumor em contatos subsequentes, indicando uma especificidade de resposta e desenvolvimento de memória imunológica.¹¹ Essa capacidade de reconhecer e reagir contra antígenos tumorais foi também detectada frente a tumores induzidos por vírus e por células tumorais irradiadas.¹² Com o desenvolvimento de técnicas de biologia celular e molecular envolvendo clonagem e uso de bibliotecas gênicas, foi possível fazer a identificação de genes que codificavam antígenos tumorais específicos, como o antígeno de melanoma família A,1 (conhecido como MAGEA1). Antígenos tumorais como o MAGEA1 não são expressos em células normais, exceto e algumas situações como em células trofoblásticas. Além disso, células T de pacientes com melanoma, capazes de reagir especificamente com antígenos tumorais, foram isoladas, comprovando a reatividade do sistema imune frente a tumores.¹² Basicamente, três tipos de antígenos

tumorais podem ser reconhecidos pelo sistema imune: (i) antígenos virais, como proteínas do papilomavirus; (ii) antígenos gerados por mutações ou rearranjo gênico, como o p53; e (iii) antígenos derivados da ativação de genes que nas células normais são inativos, como os da família MAGE (antígeno associado ao melanoma) podendo, este último, estar relacionado a um mecanismo de desmetilação de seus promotores, processo epigenético que favorece a transcrição gênica.¹³ Além desses três mecanismos, uma superexpressão de certas proteínas em células tumorais pode também resultar numa maior reatividade e/ou resposta de linfócitos T específicos, como observado para o receptor de fator de crescimento ERBB2 em certos carcinomas (tabela 1).¹⁴

A hipótese da edição de tumores

No início dos anos 2000, surgiu a hipótese de que o sistema imune não somente protege o organismo contra a formação de tumores, mas também modula a imunogenicidade dos tumores, podendo assim combater ou favorecer o crescimento tumoral.¹¹ Esse processo foi denominado de imunedição e envolve três fases: (i) eliminação, (ii) equilíbrio e (iii) escape. Na fase de eliminação, o sistema imune, envolvendo citocinas e células da imunidade inata e adquirida, é capaz de reconhecer e eliminar as células tumorais, podendo tudo ocorrer de forma assintomática. Na fase de equilíbrio, considerada a mais longa, células tumorais residuais podem permanecer em um estado de dormência, tendo o sistema imune uma eficiente capacidade de controlar o crescimento tumoral. Na fase de escape, as células tumorais que desenvolveram mecanismos de burlar o sistema imunológico passam a apresentar um crescimento acelerado e aparece um quadro sintomático. Esse escape tumoral pode ocorrer devido a diferentes mecanismos como deficiente apresentação de antígenos tumorais, baixa expressão de MHC, modulação da apoptose (morte celular programada), produção de moléculas supressoras como IL-10, TGF- β (Transforming Growth Factor- β), expressão de IDO (Indoleamine 2,3-dioxygenase), ativação de células T reguladoras (Treg) e células supressoras de origem mielóide (MDSCs), e, com destaque neste estudo, uma maior expressão de moléculas co-estimuladoras supressoras como o CTLA-4, PD-1 e PD-L1/PD-L2.^{10,15} Sanmamed e Chen descreveram que terapias antitumorais baseadas no bloqueio de mecanismos de evasão das células tumorais tem mostrado maior eficiência no tratamento do câncer. Essa nova estratégia de combate aos tumores ganhou força na última década e foi denominada de estratégia de “normalização imunológica”,² pois se baseia em recuperar ou desbloquear a capacidade de resposta imune contra os tumores. Esse novo método de tratamento se mostrou eficiente e tem apresentado menor incidência de efeitos adversos. Assim, essa nova estratégia se apresenta

Tabela 1: Tipos de antígenos tumorais.

Antígeno	Exemplos ¹³
Antígenos virais	Proteínas E6 e E7 do papilomavírus; proteínas EBNA em linfomas por EBV; proteínas do HHV-8 em tumores vasculares
Antígenos gerados por mutações ou rearranjo gênico	Proteína p53 mutada; mutações em RAS; produto de p210 de rearranjos de Bcr/Abl (CML)
Antígenos derivados da ativação de genes que nas células normais são inativos	MAGE; BAGE; GAGE; SSX2
Superexpressão de certas proteínas em células tumorais	EGFR-2; tirosinase, gp100 e MART

EGFR-2= receptor de fator de crescimento epidérmico

como uma alternativa às imunoterapias tradicionais baseadas na amplificação de mecanismos de resposta imune antitumoral, como a imunoterapia passiva e os métodos de ativação/amplificação de mecanismos efetores de resposta imune. São exemplos de imunoterapia passiva o uso de anticorpos monoclonais, como o anticorpo monoclonal (mAb) anti-CD20 no tratamento de linfoma de célula B, e mAb Her2/neu para tratar câncer de pulmão. São exemplos de terapias de ativação/amplificação: (i) o uso de vacinas com peptídeos tumorais ou com células dendríticas, visando uma melhor apresentação de antígenos tumorais; (ii) o uso de citocinas como IL-2 e interferons ou o uso de agonistas para receptores do tipo Toll (TLR – Toll-like receptors); e, (iii) o uso de terapia celular adotiva, aumentando *in vitro* a ativação e expansão de células T específicas contra antígenos tumorais, e posteriormente reinfundindo essas células nos pacientes. Vale ressaltar que a ativação ampla da resposta imune pode favorecer o combate às células tumorais, mas, por outro lado, levando o sistema imunológico a um nível suprafisiológico, pode também aumentar a incidência e a gravidade dos efeitos adversos/colaterais.²

Desta forma, tem sido aceito que a ativação sistêmica da resposta imune contra tumores não necessariamente resulta na regressão do câncer, especialmente no tratamento de tumores sólidos.¹⁶ Assim, diversos tipos de tumores conseguem modular a resposta imune a nível de seu microambiente, apresentando eficientes mecanismos de escape, e isto estimulou o desenvolvimento de novas estratégias de combate aos tumores.

O papel do CTLA-4 e do PD-1 na regulação da resposta imunológica

O CTLA 4 (CD152) é uma proteína expressa na superfície de células T ativadas após o engajamento de seu TCR. Sendo homólogo à proteína co-estimuladora CD28, o CTLA-4 se liga competitivamente e com maior afinidade às moléculas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) expressas em células apresentadoras de antígeno (APC), podendo assim regular negativamente a ativação das células T (figura 1).¹⁷ Desta forma, após exposição

prolongada e acentuada a antígenos, células T adquirem um fenótipo de “exaustão” que reduz a disponibilidade do sinal necessário para sua ativação pelas células APC, um processo que usualmente leva à anergia ou inativação funcional das células T.¹⁸

O CTLA-4 minimiza as respostas das células T através de vias intrínsecas e extrínsecas. Eventos intrínsecos incluem a inibição da tradução de proteínas, recrutamento de fosfatases, além de causar a ativação de ligases de ubiquitina, inibição da sinalização do receptor de citocinas, e inibição da formação de microdomínios lipídicos na superfície das células T. Eventos extrínsecos celulares incluem a competição pelo CD28 na ligação aos seus ligantes CD80/86, a remoção de CD80/86 da superfície de células APC, a expressão de IDO, e, em especial, a modulação da função de linfócitos T reguladores (Treg).¹⁹ Camundongos deficientes em CTLA-4 desenvolvem forte e precoce ativação de células T, resultando em respostas inflamatórias que levam à morte em cerca de 3 semanas, ressaltando a importância do CTLA-4 no controle de respostas autoimunes T-dependentes.^{2,20} O tratamento com anticorpos anti-CTLA-4, reconhecido por fazer o desbloqueio dos LT levando a uma melhor atuação dessas células no combate a tumores,³ está frequentemente associado ao desenvolvimento de reações autoimunes, reforçando o envolvimento dessa via no controle de células T auto-reativas (figura 1).

Estudos recentes indicam que as reações autoimunes observadas após o tratamento com anticorpos anti-CTLA-4 são principalmente mediadas pela depleção de células T regulatórias (T reg),²¹ o que contrasta com o conceito de que o tratamento anti-CTLA-4 representa uma modalidade de terapia do tipo inibidor de checkpoint. Assim, o tratamento com anticorpos anti-CTLA-4, por atuar desbloqueando a atividade estimuladora de células APCs, se mostra mais próximo de uma terapia de amplificação sistêmica de mecanismos de resposta imune, o que dificulta compreender a efetiva associação da modulação do CTLA-4 como inibidor de checkpoint imunológico.²

A proteína da morte celular programada-1 (PD-1) é um membro da superfamília CD28 que fornece sinais negativos por interação com seus dois ligantes,

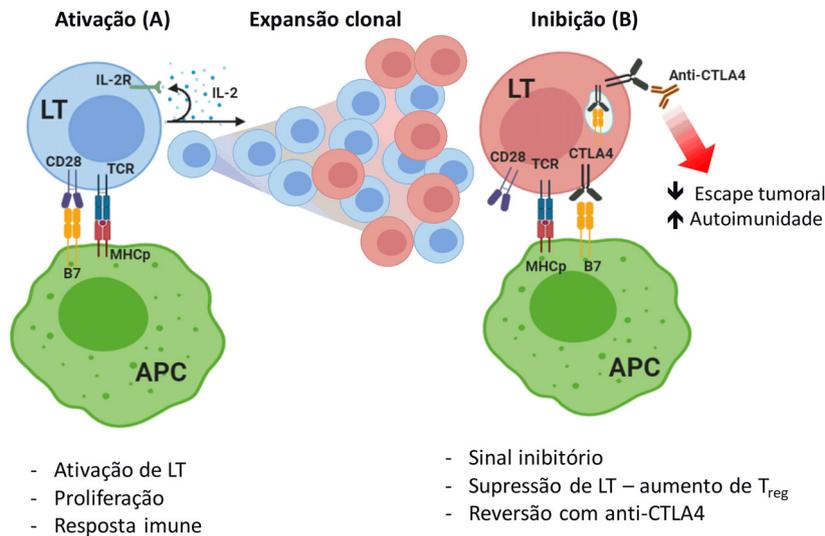


Figura 1: Regulação da ativação dos linfócitos T pela expressão de CTLA-4. A) Numa primeira etapa da ativação dos linfócitos T se observa a ligação do TCR a peptídeos apresentados por células APC via MHC e a interação da molécula co-estimuladora CD28 com seu ligante B7 (C80/C86). Isto estimula a produção de citocinas, como a IL-2, resultando na ativação e proliferação de células T. B) Células T exaustas (vermelho) passam a expressar o receptor inibitório CTLA-4 capaz de se ligar com maior afinidade ao B7 (CD80/CD86) resultando em sinal inibitório/supressão da resposta imune. O uso de anticorpos anti-CTLA-4 pode inibir a atividade supressora do CTLA-4, potencializando a ativação das células T, que assim podem exibir maior atividade antitumoral ou favorecer o desenvolvimento de reações autoimunes.

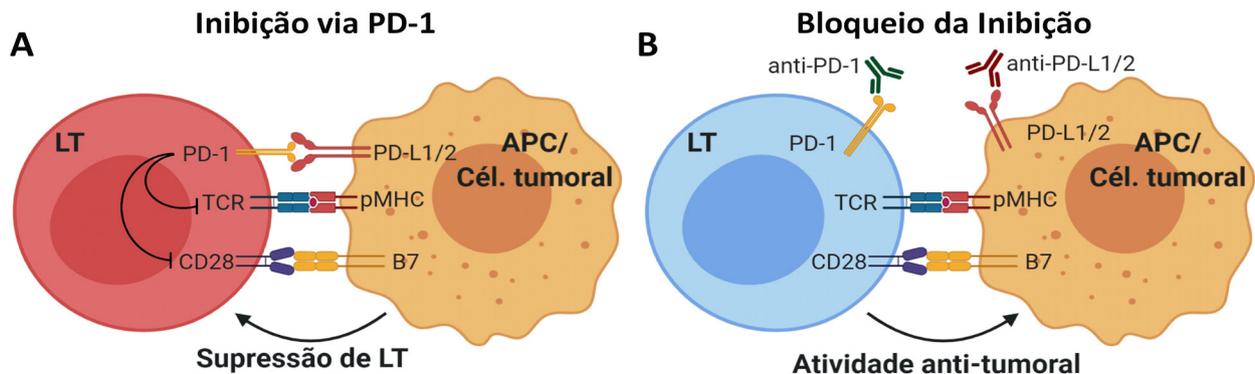


Figura 2: A inibição da ativação dos linfócitos T via PD-1 pode ser revertida com anticorpos anti-PD-1 e/ou anti-PD-L1/2. A) A ligação do PD-1 com seus ligantes PD-L1/PD-L2 presentes em células apresentadoras de antígeno (APC) ou células tumorais causa supressão da ativação dos linfócitos T via inibição de sinais envolvendo o reconhecimento de antígenos pelo TCR e ligação de moléculas co-estimuladoras (CD28, B7). B) O tratamento com anticorpos anti-PD-1 ou anti-PD-L1/2 bloqueia esse mecanismo de inibição favorecendo a atividade anti-tumoral dos linfócitos T. PD-1 = proteína-1 de morte celular programada. TCR = receptor da célula T.

PD-L1 e PD-L2. A PD-1 e seus ligantes são amplamente expressos em diferentes tipos celulares e podem controlar a ativação dos linfócitos T (figura 2). Após a apresentação e reconhecimento contínuo de antígenos tumorais, as células T efetoras específicas contra o tumor aumentam a expressão de PD-1 e secretam IFN-gama, citocina que induz a expressão de B7-H1 (PD-L1) em células tumorais. A interação PD-L1-PD-1 suprime a ativação das células T interrompendo a atividade de células T antitumorais. Essa interrupção da resposta

antitumoral das células T, relacionado a um fenótipo de “exaustão” ou anergia dos linfócitos T, representa uma forma de imunodeficiência local que permite que os tumores escapem da vigilância imunológica.²² O significado biológico da PD-1 e do CTLA-4 sugere um potencial terapêutico da manipulação dessas proteínas contra várias doenças humanas, como, por exemplo, a malária, e, em especial, o câncer.^{23,24}

O impacto do uso de inibidores de checkpoint

no tratamento do câncer

Nos últimos anos, após aprovação por agências reguladoras no Brasil e em outros países, o desenvolvimento de imunoterapias envolvendo a modulação da resposta imune com o uso de anticorpos monoclonais anti-CTLA-4 e anti-PD-1/PD-L1 viabilizou uma nova realidade para pacientes com melanoma, câncer de pulmão e diversas outras neoplasias. Todavia, essa ativação imune, particularmente de linfócitos T, leva ao risco do desenvolvimento de respostas direcionadas a tecidos saudáveis que se manifestam clinicamente como eventos adversos, além disso existem ainda divergências quanto a sua efetividade no tratamento de alguns tipos de câncer. Barry et al²⁵, mostraram que imunoterapias anti-CTLA-4 ou anti-PD-1 proporcionam proteção duradoura aos pacientes, sendo comum, no entanto, que mais de 80% dos pacientes não tenham respostas objetivas a esses tratamentos. Enfu Hui,²⁶ por sua vez, destaca que o benefício durável dessas imunoterapias é observado apenas em uma pequena fração dos pacientes.

O ipilimumabe, anticorpo humanizado que reage especificamente contra o co-receptor inibitório CTLA-4, foi aprovado pela agência federal americana Food and Drug Administration (FDA) em 2014 e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2019, para o tratamento de melanoma metastático. Alguns autores mostraram que, enquanto um pequeno grupo de pacientes com melanoma desenvolve uma resposta objetiva ao tumor (15% a 20%), toxicidades graves (graus 3 a 5) são mais comuns (30%), sugerindo que esse agente ativa mais efetivamente a reatividade de células T em vez de sua atividade específica frente ao tumor.^{2,21} Isso porque, na clínica, os anticorpos anti-CTLA-4 (ipilimumabe) induzem reações auto-imunes frequentes que confirmam a importância dessa via no controle de células T auto-reativas.²⁷ Estudos em modelo murino demonstraram que a perda de CTLA-4 em camundongos leva a um distúrbio linfoproliferativo dramático onde os animais morrem dentro de 3-5 semanas de idade.²⁰ Está em debate se essas reações autoimunes detectadas após o tratamento com ipilimumabe ocorrem devido à perda da função CTLA-4 em células T convencionais, células T reguladoras ou ambas. Dados clínicos ilustram que as reações adversas são mais frequentes que a resposta tumoral, essa provavelmente é a razão pela qual o ipilimumabe foi aprovado para tratar melanoma metastático, mas não demonstrou benefício clínico em outros tipos de tumores nos quais foi testado como terapia de agente único.^{27,28,29}

O tratamento com anti-PD-1 e anti-PD-L1, por sua vez, tem sido notavelmente efetivo na reativação das respostas das células T aos tumores. Migden et al³⁰ estudando o bloqueio com anti-PD-1 (Cemiplimab) em pacientes com carcinoma avançado de células escamosas cutâneas, o segundo câncer de pele mais comum na

população, demonstraram que esse medicamento é capaz de induzir uma resposta bem-sucedida em aproximadamente metade dos pacientes. Além disso, uma resposta profunda e duradoura foi observada no paciente com carcinoma de células escamosas cutâneo metastático. Recentemente, a ANVISA aprovou o primeiro tratamento com imunoterapia para pacientes com câncer de mama triplo negativo metastático no país, baseado no bloqueio do PD-1 com atezolizumabe.³¹ O estudo comprovou a redução de 38% do risco de progressão da doença ou morte, e ganho de 10 meses de sobrevida global.

A tabela 2 descreve outras imunoterapias, suas indicações, seus mecanismos de ação e seus principais resultados em ensaios clínicos. A combinação de duas imunoterapias já foi relatada com sucesso, como exemplo, o nivolumabe combinado a ipilimumab teve melhores resultados do que o uso desses medicamentos isoladamente no tratamento de melanoma metastático. Nivolumabe e pembrolizumabe, como outros anti-PD1, anti-PD-L1 e combinações com anti-CTLA-4, estão em teste para uma gama de tumores, com resultados preliminares animadores.³²

DISCUSSÃO

É importante ressaltar que muitas questões relacionadas às novas terapias baseadas em inibidores de checkpoint imunológico surgiram e precisam ser solucionadas ou enfrentadas. Primeiro, nem todos os tipos de câncer, assim como nem todos os pacientes, testados em ensaios clínicos imunoterapêuticos, foram sensíveis ao tratamento. Oliva et al³⁶ descreveram que o resultado do bloqueio de PD-1/PD-L1, usando nivolumab e pembrolizumab, no melanoma metastático (MM) foi inferior aos resultados obtidos em tumores sólidos. Provavelmente devido à redução da função imune típica do sistema imunológico dos pacientes afetados pelo MM. Além disso, foi relatada uma alta toxicidade em ensaios clínicos randomizados com pembrolizumabe associado à lenalidomida e à pomalidomida, imunomoduladores derivados da talidomida, o que levou o FDA a interromper os ensaios que exploravam essas combinações.³⁶

Em segundo lugar, ainda não está claro como podem ser monitorados os sucessos da imunoterapia. No tratamento do MM com ipilimumab, Nyakas et al³⁷ demonstraram que nenhum biomarcador está atualmente disponível para prever o benefício do tratamento. Estudos mais amplos com acompanhamento de longo prazo são necessários para avaliar moléculas, como a endostatina e a Gal3BP, entre outras, como potenciais biomarcadores para a sobrevida a longo prazo após a terapia com ipilimumabe. Foi sugerido que níveis de mutações tumorais em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células, que não responderam ao tratamento de primeira linha, poderiam dar um

Tabela 2: Imunoterapias com inibidores de checkpoint, indicações, resultados e principais efeitos adversos.

Referência	Anticorpo/ Medicamento	Indicação	Resultados e efeitos adversos
Hodi et al ²⁷	Anti CTLA-4 Ipilimumabe	Melanoma metastático	Melhora da sobrevida global. Efeitos gastrointestinais (diarreia) e dermatológicos.
Postow et al ³³	Anti CTLA-4 Ipilimumabe	Melanoma metastático	Sobrevida maior combinado com Nivolumabe. Apresenta diarreia e colite.
Garon et al ³⁴	Anti-PD1 Pembrolizumabe	CPCNP metastático	Atividade antitumoral significativa. Fadiga, prurido e redução do apetite.
Robert et al ³⁵	Anti-PD1 Nivolumabe	Melanoma metastático sem mutação em BRAF	Melhora da sobrevida global. Apresenta fadiga, prurido e náusea.
Schmid et al ³¹	Anti-PD1 Atezolizumabe	Câncer de mama triplo negativo metastático	Melhora da sobrevida. Apresenta hipotireoidismo, alopecia e náuseas.
Migden et al ³⁰	Anti-PD1 Cemiplimab	Carcinoma avançado de células escamosas cutâneas	Resposta bem-sucedida em metade dos pacientes. Diarreia, fadiga, náusea e constipação.

CPCNP= carcinoma de pulmão de células não pequenas. BRAF= Proto-oncogene B-Raf. Adaptado de Kaliks.³²

indicativo de quais desses pacientes responderiam ao tratamento com atezolizumabe. O estudo mostra que um nível elevado de mutações do tumor é um biomarcador clinicamente acionável para os inibidores do checkpoint imunológico nesse tipo de câncer.³⁸ Ainda há o fato de os inibidores do checkpoint imunológico serem mais eficazes em indivíduos com níveis elevados de PD-1/PD-L1.

Alta expressão de PD-1 e PD-L1 nos tecidos tumorais pode estar associada a um melhor prognóstico de diversos tipos de câncer, como o de mama e o câncer colorretal, indicando que o nível de PD-L1 por si só é insuficiente para prever se a via de PD-1 contribui para a evasão imunológica do tumor.^{38,39} Utilizando citometria de fluxo e usando modelos *in vitro*, Zhao et al³⁹ demonstraram que tanto o PD-1 quanto o PD-L1 podem ser co-expressos em células tumorais e em células APCs presentes no microambiente tumoral. Ligações entre o PD-L1 com o PD-1 numa mesma célula podem ocorrer e são chamadas de ligações em cis. Esse tipo de interação pode inibir a capacidade do PD-L1 (presente em células tumorais ou células APCs) de se ligar em trans ao PD-1 de células T, reprimindo a sinalização inibitória entre PD-L1 / PD-1. Neste caso, o bloqueio seletivo com anti-PD-1 poderia expor moléculas PD-L1 em células tumorais e favorecer sua atividade inibitória sobre a vigilância do sistema imune.³⁹

A combinação da terapia com inibidores do checkpoint imunológico com outras terapias imunológicas e terapias convencionais como a quimioterapia e a radioterapia, vem sendo amplamente testadas.⁴⁰ Terapias combinadas com vacinas de células dendríticas, linfócitos infiltrantes de tumor (TIL), células T modificadas pelo receptor de antígeno quimérico (terapia CAR-T), entre

outras, tem apresentado efeitos sinérgicos e melhores respostas, embora algumas mostrem alta toxicidade. Estudos revelam que células dendríticas e células natural killer (NK) também se agrupam como uma potencial ferramenta prognóstica para imunoterapia dirigida por células T. A compreensão dos mecanismos que regulam sua abundância no microambiente tumoral pode revelar novas oportunidades terapêuticas.²⁵

Usando animais deficientes do receptor inibidor TIGIT (domínio de motivo inibidor baseado em tirosina do imunorreceptor), ou usando tratamento com anticorpos bloqueadores de TIGIT, Stojanovic e Cerwenka mostraram que inibidores de checkpoint também podem atuar em células natural killer (NK).⁴¹ Resultados semelhantes foram também observados, embora em menor grau, em camundongos imunodeficientes de células T e B (camundongos RAG^{-/-}), o que indica que, mesmo na ausência de células T e células B, as células NK podem, por si só, apresentar uma forte atividade antitumoral após o bloqueio do TIGIT.⁴¹ Outras imunoterapias baseadas na modulação da atividade citotóxica de células NK, como inibidores de NKG2A, estão sendo investigadas e podem trazer resultados melhores.⁴²

CONCLUSÃO

O uso de inibidores de checkpoint na terapia contra o câncer, em especial a terapia anti-PD1/ PD-L1, tem mostrado ser possível alcançar maior eficiência no tratamento do câncer com redução de efeitos adversos. Além disso, tem contribuído no maior conhecimento de defeitos específicos da imunidade contra os tumores, e ajudado no desenvolvimento de novas estratégias

de tratamento que possam atuar no microambiente tumoral. Novas pesquisas vêm sendo direcionadas para a busca de biomarcadores prognósticos e preditivos para definir os pacientes com maior potencial de resposta a regimes de imunoterapia com toxicidade mínima. O uso de terapias combinadas, envolvendo diferentes terapias celulares e novos tratamentos com inibidores de checkpoint que atuam em células da imunidade inata e adquirida, podem aumentar ainda mais a eficácia do tratamento antitumoral.

FINANCIAMENTO

HCT agradece o apoio do CNPq (auxílio 311036/2015-5). LSD recebeu bolsa PIBIC/CNPq. EEO recebeu bolsa CAPES/PNPD.

REFERÊNCIAS

- Organização das Nações Unidas (BR). OMS: câncer mata 8,8 milhões de pessoas anualmente no mundo [Internet]. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/oms-cancer-mata-88-milhoes-de-pessoas-anualmente-no-mundo/>
- Sanmamed MF, Chen L. A paradigm shift in cancer immunotherapy: from enhancement to normalization. *Cell*. 2018; 175(2):313-26. doi: 10.1016/j.cell.2018.09.035
- Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*. 1996; 271(5256):1734-6. doi: 10.1126/science.271.5256.1734
- Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *PNAS*. 2002; 99(19):12293-7. doi: 10.1073/pnas.192461099
- Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*. 1970; 13:1-27.
- Thomas L. Discussion of cellular and humoral aspects of hypersensitive states. In: Lawrence HS. Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. New York: Hoeber-Harper; 1959. 529-532.
- Ribatti D. The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget*. 2016; 8(4):7175-80. doi: 10.18632/oncotarget.12739
- Garcia-lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol*. 2003; 195(3):346-55. doi: 10.1002/jcp.10290
- Zinkernagel RM, Doherty PC. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of Polymorphic major transplantation antigens determining T-Cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv Immunol*. 1979; 27:51-177. doi: 10.1016/S0065-2776(08)60262-X
- Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: mechanisms of action, efficacy, and limitations. *Front Oncol*. 2018; 8(86). doi: 10.3389/fonc.2018.0008
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011; 331(6024):1565-70. doi: 10.1126/science.1203486
- Coulie PG, Van den Eynde BJ, Van der Bruggen P, Boon T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14(2):135-46. doi: 10.1038/nrc3670
- Van der Bruggen P, Zhang Y, Chaux P, Stroobant V, Panichelli C, Schultz ES et al. Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. *Immunol Rev*. 2002; 188(1):51-64. doi: 10.1034/j.1600-065x.2002.18806.x
- Fisk B, Blevins TL, Wharton JT, Ioannides CG. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J Exp Med*. 1995; 181(6):2109-17. doi: 10.1084/jem.181.6.2109
- Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev of Immunol*. 2011; 29:235-71. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101324
- Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*. 2018; 359(6382):1350-5. doi: 10.1126/science.aar4060
- Chikuma S, Abbas AK, Bluestone JA. B7-independent inhibition of T cells by CTLA-4. *J Immunol*. 2005; 175(1):177-81. doi: 10.4049/jimmunol.175.1.177
- Ha SJ, West EE, Araki K, Smith KA, Ahmed R. Manipulating both the inhibitory and stimulatory immune system towards the success of therapeutic vaccination against chronic viral infections. *Immunol Rev*. 2008; 223:317-33. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00638.x
- Brunner-Weinzierl MC, Rudd CE. CTLA-4 and PD-1 Control of T-cell motility and migration: implications for tumor immunotherapy. *Front Immunol*. 2018; 9:2737. doi: 10.3389/fimmu.2018.02737
- Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science*. 1995; 270:985-88. doi: 10.1126/science.270.5238.985

21. Arce Vargas F, Furness AJS, Litchfield K, Joshi K, Rosenthal R, Ghorani E et al. Fc Effector function contributes to the activity of human anti-CTLA-4 Antibodies. *Cancer Cell*. 2018; 33(4):649-63. doi: 10.1016/j.ccell.2018.02.010
22. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med*. 2012; 4(127). doi: 10.1126/scitranslmed.3003689
23. Antonelli LR, Junqueira C, Vinetz JM, Golenbock DT, Ferreira MU, Gazzinelli RT. The immunology of *Plasmodium vivax* malaria. *Immunol Rev*. 2019;1-27. doi: 10.1111/imr.12816
24. Jin HT, Ahmed R, Okazaki T. Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. *Curr Top Microbiol and Immunol*. 2011; 350:17-37. doi: 10.1007/82_2010_116
25. Barry KC, Hsu J, Broz ML, Cueto FJ, Binnewies M, Combes AJ et al. A natural killer–dendritic cell axis defines checkpoint therapy–responsive tumor microenvironments. *Nat Med*. 2018; 24(8):1178-91. doi: 10.1038/s41591-018-0085-8
26. Hui E. Immune checkpoint inhibitors. *J Cell Biol*. 2019; 218(3):740. doi: 10.1083/jcb.201810035
27. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010; 363(8):711-23. doi: 10.1056/NEJMoa1003466
28. Bilusic M, Madan RA, Gulley JL. Immunotherapy of prostate cancer: facts and hopes. *Clin Cancer Res*. 2017; 23(22):6764-70. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0019
29. Lynch TJ, Bondarenko I, Luft A, Serwatowski P, Barlesi F, Chacko R et al. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer: results from a randomized, doubleblind, multicenter phase II study. *J Clin Oncol*. 2012; 30(17):2046-54. doi: 10.1200/JCO.2011.38.4032
30. Michael R, Migden MR, Rischin D, Schmults CD, Guminski A, Hauschild A et al. PD-1 blockade with cemiplimab in advanced cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2018; 379:341-35. doi 10.1056/NEJMoa1805131
31. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2018; 379:2108-21. doi: 10.1056/NEJMoa1809615
32. Kaliks R. Avanços em oncologia para o não oncologista. *Einstein*. 2016; 14(2):294-9. doi: 10.1590/S1679-45082016MD3550
33. Postow M. Managing immune checkpoint-blocking antibody side effects. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2015; 76-83. doi: 10.1200/JCO.2017.77.6385
34. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leigh N, Balmanoukian AS, Eder JP, Patnaik A et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015; 372(21):2018-28. doi: 10.1056/NEJMoa1501824
35. Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*. 2015; 372(26):2521-32. doi: 10.1056/NEJMoa1503093
36. Oliva S, Troia R, D'Agostino M, Boccadoro M, Gayet F. Promises and pitfalls in the use of PD-1/PD-L1 inhibitors in multiple myeloma. *Front Immunol*. 2018; 9:2749. doi: 10.3389/fimmu.2018.02749
37. Nyakas M, Aamdal E, Jacobsen KD, Guren TK, Aamdal S, Hagene KT et al. Prognostic biomarkers for immunotherapy with ipilimumab in metastatic melanoma. *Clin Exp Immunol*. 2019; 197(1):74-82. doi: 10.1111/cei.13283
38. Stower H. A blood-based biomarker for checkpoint inhibition. *Nat Med*. 2018; 24(12):1781. doi: 10.1038/s41591-018-0282-5
39. Zhao Y, Harrison YS, Song Y, Ji J, Huang J, Hui E. Antigen-presenting cell-intrinsic PD-1 neutralizes PD-L1 in cis to attenuate PD-1 signaling in T cells. *Cell Rep*. 2018; 24(2):379-90. doi: 10.1016/j.celrep.2018.06.054
40. Selinger B. The role of the lymphocyte functional cross-talk and regulation in the context of checkpoint inhibitor treatment-review. *Front Immunol*. 2019; 10:2043. doi: 10.3389/fimmu.2019.02043
41. Stojanovic A, Cerwenka A. Checkpoint inhibition: NK cells enter the scene. *Nat Immunol*. 2018; 19(7):650-2. doi: 10.1038/s41590-018-0142-y
42. Haanen JB, Cerundolo V. NKG2A, a new kid on the immune checkpoint block. *Cell*. 2018; 175(7):1720-2. doi: 10.1016/j.cell.2018.11.048