U.PORTO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Impacto prognóstico da citotoxicidade celular dependente de anticorpos no cancro colorretal

Artigo de revisão bibliográfica

JOÃO CARLOS CARVALHO TARRIO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM **MEDICINA**

2017

Dissertação elaborada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Medicina

Título: Impacto prognóstico da citotoxicidade celular dependente de anticorpos no cancro colorretal

Autor: João Carlos Carvalho Tarrio[1]

Orientadora: Dra. Ana Filipa Martins Ferreira Castro[2]

Afiliação: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto; Centro Hospitalar Universitário do Porto

[1] – Aluno do 6º ano profissionalizante do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto; número de aluno: 201204381

Endereço eletrónico: joaotarrio@gmail.com

[2] – Assistente Hospitalar de Oncologia Médica do Centro Hospitalar Universitário do Porto – Hospital de Santo António; Professora Assistente no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto

Endereço eletrónico: anafmferreira@yahoo.com

RESUMO

Introdução: o cancro colorretal é o terceiro mais frequente e uma das principais causas de morte por cancro, sendo considerado um grave problema de saúde. Em Portugal surgem todos os anos mais de sete mil novos casos. O tratamento do cancro colorretal metastático evoluiu nas últimas duas décadas e a sobrevida global aumentou cerca de dez a trinta meses. Esta melhoria significativa no prognóstico destes doentes deve-se à introdução de fármacos biológicos como o cetuximab, que são anticorpos monoclonais dirigidos a antigénios tumorais específicos, os recetores do fator de crescimento epidérmico, envolvidos na transmissão de sinais de proliferação, angiogénese e metástase. Os anticorpos monoclonais expõem as células tumorais ao sistema imunológico, obtendo uma resposta imune que pode ser mediada por citotoxicidade celular dependente de anticorpos. Esta é a resposta das células imunes inatas que exercem citotoxicidade antitumoral e é ativada quando o fragmento Fc do anticorpo interage com o recetor Fc nas células do sistema imunológico. A identificação de tumores dependentes deste tipo de sinalização e, por isso, suscetíveis a esta terapia, tornou-se imprescindível.

Objetivo: determinar o impacto da citotoxicidade celular dependente de anticorpos no prognóstico dos doentes com cancro colorretal, através de uma profunda pesquisa sobre o tema, tendo por base a leitura de artigos científicos publicados em revistas indexadas.

Desenvolvimento: na era da imunoterapia no tratamento do cancro colorretal, o objetivo é cada vez mais potenciar os seus resultados. O conhecimento acerca do papel da citotoxicidade celular dependente de anticorpos permite-nos equacionar se este poderá ser um bom marcador para a eficácia da terapia.

Conclusão: o nível de citotoxicidade celular dependente de anticorpos exercido por células *natural killer* na presença de cetuximab pode ser útil como marcador prognóstico.

Palavras chave: cancro colorretal metastático, citotoxicidade celular dependente de anticorpos, biomarcadores prognósticos, terapia anti-recetor do fator de crescimento epidérmico

ABSTRACT

Introduction: Colorectal cancer is the third most frequent and one of the main causes of cancer death, and is considered a serious health problem. In Portugal, more than seven thousand new cases emerge every year. Treatment of metastatic colorectal cancer has evolved over the past two decades and overall survival has increased by about 10 to 30 months. This significant improvement in the prognosis of these patients is due to the introduction of biological drugs such as cetuximab, which are monoclonal antibodies directed to specific tumor antigens, epidermal growth factor receptors, involved in the transmission of signs of proliferation, angiogenesis and metastasis. Monoclonal antibodies expose tumor cells to the immune system, resulting in an immune response that can be mediated by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. This is the response of innate immune cells that exert antitumor cytotoxicity and is activated when the Fc fragment of the antibody interacts with the Fc receptor in the cells of the immune system. The identification of tumors dependent on this type of signaling and, therefore, susceptible to this therapy, became essential.

Objective: To determine the impact of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity on the prognosis of patients with colorectal cancer, through an extensive research on the subject, based on the reading of scientific articles published in indexed journals.

Development: In the era of immunotherapy in the treatment of colorectal cancer, the goal is increasingly to potentiate its results. The knowledge about the role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity allows us to equate if this may be a good marker for the efficacy of the therapy.

Conclusion: the level of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity exerted by natural killer cells in the presence of cetuximab may be useful as a prognostic biomarker.

Key Words: metastatic colorectal cancer, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, prognostic biomarkers, anti-epidermal growth factor receptor therapy

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora pela disponibilidade, atenção dispensada, paciência, dedicação e profissionalismo.

À minha família, em particular aos meus pais, irmã, cunhado e sobrinhos pelo incentivo, compreensão e encorajamento, durante este período.

À minha tia que faleceu recentemente e que foi inspiração para a escolha do tema.

Aos meus amigos e colegas pelos momentos de entusiasmo partilhados em conjunto.

A todos os demais.

A diferença entre o possível e o impossível

está na vontade humana.

Louis Pasteur (1822-1895)

ÍNDICE

Lista de abreviaturas ..... pág. 1

Introdução ..... pág. 2

Metodologia ..... pág. 5

Resultados ..... pág. 6

Discussão ..... pág. 7

Conclusões ..... pág. 12

Referências bibliográficas ..... pág. 13

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs – anticorpos

ADCC – citotoxicidade celular dependente de anticorpos

ADCP – fagocitose celular dependente de anticorpos

CCR – cancro colorretal

CCRm – cancro colorretal metastático

CDC – citotoxicidade dependente do complemento

CEA – antigénio carcino-embrionário

EGFR – recetor do fator de crescimento epidérmico

Fc – fragmento c

FcR – recetor do fragmento c

GTP – guanosina trifosfato

GTPase – enzima hidrolase que se liga ao GTP

IgG – imunoglobulina G

iNKT – células T NK invariante

mAbs – anticorpos monoclonais

MHC – complexo principal de histocompatibilidade

mut – mutado

NK – *natural killer*

SG – sobrevida global

SNP – polimorfismo de nucleotídeo único

SLP – sobrevida livre de progressão

wt – tipo selvagem

INTRODUÇÃO

O cancro colorretal (CCR) é a terceira neoplasia maligna mais frequente em todo o mundo e uma das principais causas de mortalidade relacionada com cancro[1].

Em Portugal, o CCR é o terceiro mais frequente e o segundo mais mortal, sendo a taxa de incidência padronizada de cancro do cólon de 42,3 (por 100.000 habitantes) no sexo masculino e 24,2 no sexo feminino; a de cancro do reto é de 22,6 e 10,4, respetivamente. A taxa de mortalidade padronizada de cancro do cólon é de 19,7 (por 100.000 habitantes) no sexo masculino e 10,7 no sexo feminino; a de cancro do reto é de 8,6 e 4,0, respetivamente. É de notar também a assimetria interior-litoral que se reflete numa maior incidência e mortalidade no interior do país. Dado que são 11,655 os anos potenciais de vida perdidos por CCR, torna-se prioritária a intervenção neste tipo de cancro pelo impacto relativo na mortalidade precoce[2].

A maioria dos casos de CCR é diagnosticada numa fase avançada, em estadio III ou IV (de acordo com o sistema TNM), ou seja, com metástases nos gânglios linfáticos e/ou noutros órgãos, respetivamente. Estas metástases apresentam uma elevada resistência às terapias convencionais, tornando o CCR uma das principais causas de morte por cancro[3,4,5]. Por estas razões, é fulcral a utilização de biomarcadores moleculares e farmacogenómicos e/ou outros agentes biológicos, para prever a resposta clínica ao tratamento, de modo a desenvolver quimioterapias dirigidas para os doentes com CCR.

O tratamento do CCR metastático (CCRm) nos últimos vinte anos sofreu uma melhoria significativa com aumento da sobrevida global (SG) de aproximadamente dez para trinta meses. Este aumento é devido à introdução, em tratamentos sistémicos, de agentes biológicos dirigidos quer à angiogénese, tais como o bevacizumab, o aflibercept e o regorafenib, quer ao recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), como o cetuximab e o panitumumab[6].

O EGFR encontra-se sobre-expresso no CCR na superfície da célula cancerígena. Transmite sinais de proliferação celular, angiogénese, invasão e metastização, logo está correlacionado com mau prognóstico, tornando-se um alvo atrativo para a terapia com anticorpos monoclonais (mAbs)[7,8].

O cetuximab foi o primeiro agente desenvolvido contra o EGFR, é um mAb quimérico IgG1, que impede a ligação do ligando ao recetor, inibindo a ativação das cascatas de sinalização bioquímica envolvidas no desenvolvimento tumoral, tendo efeitos antiproliferativos e proapoptóticos diretos. O panitumumab, por sua vez é um mAb humanizado IgG2, também

aprovado para doentes com CCRm. Ambos são usados em combinação com a quimioterapia, quer em primeira ou segunda linha, ou de forma isolada na doença refratária. A identificação de tumores dependentes da sinalização do EGFR, logo suscetíveis à terapêutica anti-EGFR, tornou-se mandatória, visto que as taxas de resposta ao cetuximab em doentes não selecionados eram menores que 30%[7,9,10].

O KRAS é uma proteína citoplasmática de ligação ao GTP com baixa atividade de GTPase. Quando o GTP se liga ao KRAS, os sinais de proliferação celular e inibição da apoptose são libertados, atuando o KRAS como um oncogene clássico. As mutações do KRAS foram encontradas principalmente no exão 2, causando a inibição da atividade de GTPase e o bloqueio da proteína KRAS na forma ativa. Estas mutações oncogénicas, ao ativarem a via RAS/RAF/MAPK, tornam o EGFR um alvo terapeuticamente inadequado[11]. O KRAS e o NRAS são membros da família de oncogenes RAS estreitamente relacionados. Alterações nos exões 2, 3 e 4 de qualquer dos genes ativam constitutivamente o RAS e são mutuamente exclusivas, o que sugere redundância funcional. Até agora, vários ensaios clínicos randomizados validaram as mutações do RAS como fatores preditivos negativos da resposta do CCR à terapia anti-EGFR[12,13,14,15]. Neste sentido, a Agência Europeia do Medicamento (EMA) restringiu a utilização do cetuximab e do panitumumab a doentes com CCR KRAS-wt (tipo selvagem, sem mutação) ou sem mutação nos codões 12, 13, 59, 61, 117 e 146 do NRAS, definidos como doentes RAS-wt, porque apenas nestes resulta numa boa, embora limitada, melhoria clínica[16,17,18].

A citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) é uma resposta de células do sistema imune inato que exerce citotoxicidade antitumoral e é ativada quando o fragmento Fc do anticorpo interage com o recetor Fc (FcR) das células imunitárias. A ADCC foi proposta como um mecanismo paralelo dos efeitos antitumorais do cetuximab, contudo a sua contribuição específica na resposta clínica, bem como a influência das mutações do RAS e do BRAF na ADCC mediada pelo cetuximab, não estão totalmente esclarecidas[10,14,19]. Seo et al. (2014) observaram que a ADCC está significativamente relacionada com os níveis de EGFR, mas não com mutações no KRAS e/ou BRAF[20]. Alguns polimorfismos que regulam as interações Fc:FcR foram descritos como relevantes no nível de ADCC induzido pelo cetuximab[21]. Em particular, a resposta à terapia com mAbs tem sido correlacionada com polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) específicos em genes FCGR2A (H131R) e FCGR3A (V158F)[22]. No entanto, os dados são até agora contraditórios, uma vez que provieram principalmente de estudos pouco potentes com pequenas amostras[23,24]. O panitumumab exerce uma fraca atividade de ADCC devido à sua natureza de IgG2[25].

As células *natural killer* (NK) são os linfócitos citotóxicos mais eficazes a combater o cancro, e têm sido extensivamente estudadas em várias doenças malignas hematológicas, no

entanto, a terapia com células NK dirigida a tumores sólidos ainda está em desenvolvimento. As células NK combatem as células tumorais por citotoxicidade natural e podem também ser ativadas por ligação de mAbs de IgG1 por meio de FcRs (CD16 / FcγRIIIa) na sua superfície, mediando deste modo a ADCC. A terapia adotiva com células NK *in vivo* tem determinadas limitações, incluindo a falta de especificidade. O fármaco cetuximab pode mediar a ADCC através de células NK *in vivo*, e tem sido aprovado para o tratamento de primeira linha do CCRm EGFR positivo. Ainda assim, a eficácia clínica deste tratamento é dificultada por mutações no gene RAS, permitindo os tumores de escapar à terapia mAb anti-EGFR[8,9,18,26,27].

Os fármacos que se dirigem às células NK, células T, macrófagos e células dendríticas podem aumentar a resposta imunitária e incrementar a atividade antitumoral dos mAb[28]. As células iNKT são linfócitos T com um rearranjo da cadeia α do recetor do antigénio da célula T invariante que co-expressa marcadores NK. Um défice de células iNKT circulantes está ligado a uma fraca resposta clínica, sugerindo um papel crítico na resposta imune contra o tumor. Além disso, a determinação do nível das células iNKT pode ajudar a determinar quais os doentes que podem beneficiar de terapêuticas adjuvantes imunoterapêuticas que visam reconstituir o reservatório das células iNKT circulantes[23,29].

Esta revisão bibliográfica tem como objetivo determinar o impacto da ADCC no prognóstico dos doentes com CCR, de forma a perceber a evolução para um tratamento mais personalizado do CCRm e o reflexo no prognóstico destes doentes, através da utilização de biomarcadores prognósticos e preditivos para a selecionar doentes para a terapia anti-EGFR.

METODOLOGIA

Esta revisão bibliográfica foi efetuada por pesquisa eletrónica na base de dados *MEDLINE/Pubmed*, através das seguintes palavras-chave: "*ADCC*" e "*Colorectal Cancer*". O último levantamento foi a 20 de fevereiro de 2017.

Foram consideradas elegíveis todas as publicações em língua inglesa, com texto completo gratuito e sem limitações temporais.

Procedeu-se à leitura do título e resumo de todos os artigos recolhidos, de forma a selecionar os cientificamente mais relevantes, mais recentes e provenientes de revistas com maior fator de impacto (*Impact Factor 2015 Journal Citation Report*®) para posteriormente serem extraídos os dados.

Foram ainda incluídas as referências dos artigos selecionados para revisão no sentido de identificar estudos adicionais relevantes.

RESULTADOS

As pesquisas conduziram ao levantamento de 27 artigos, dos quais foram selecionados 15 para leitura do texto completo.

Foram excluídos 12 artigos segundo os seguintes critérios (fig.1): (1) artigos sobre novas terapêuticas (n=4); (2) revisões sistemáticas não CCR-específicas (n=2); (3) artigos sobre vacinação (n=2); (4) artigo sobre cancro do pâncreas (n=1); (5) estudo de caso (n=1); (6) artigo de revista com fator de impacto <1 (n=1); (7) artigo publicado em 1988 (n=1).

Via lista de referências bibliográficas foram obtidas 21 publicações adicionais.

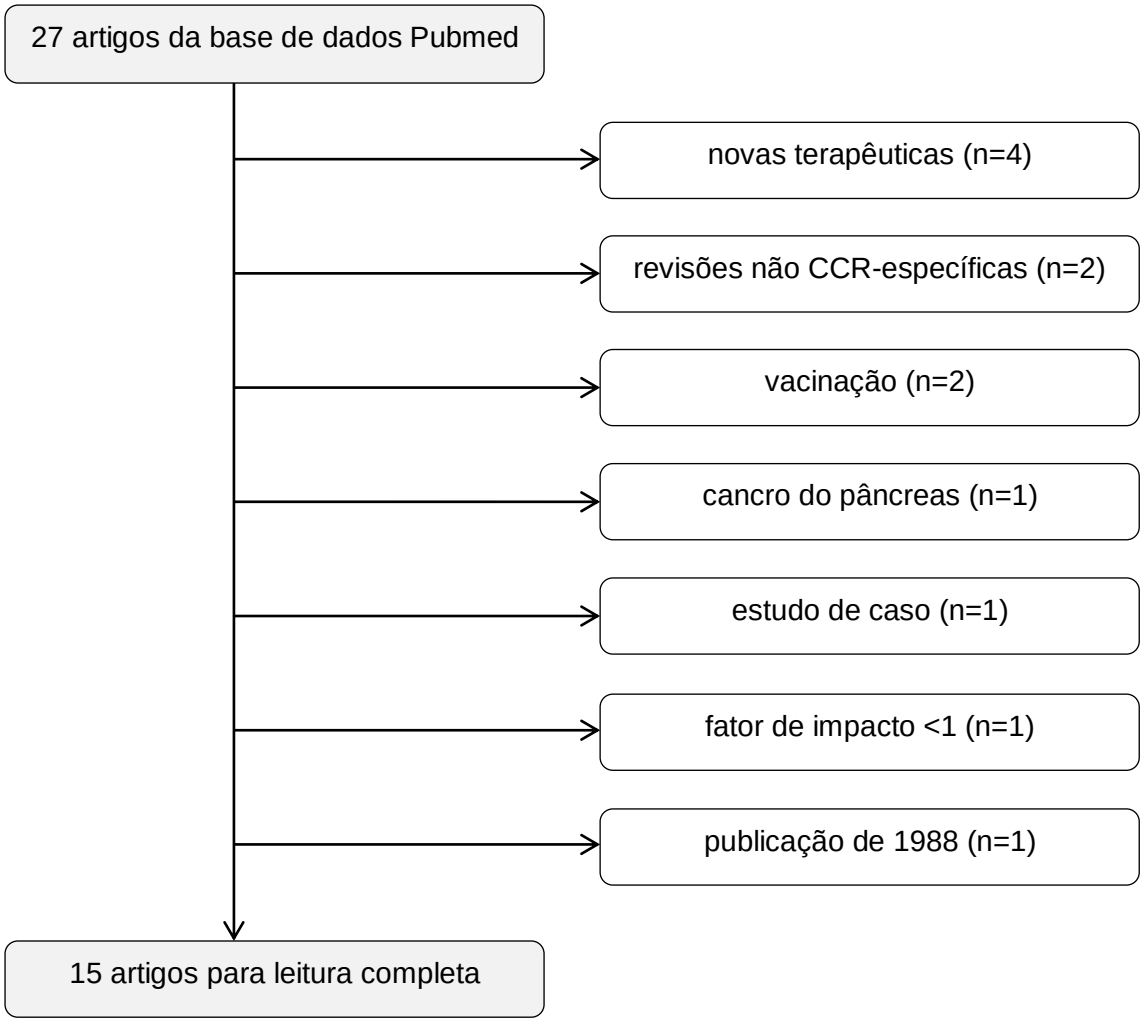


Figura 1 – Fluxograma da aplicação dos critérios de inclusão e exclusão.

DISCUSSÃO

Foram vários os estudos que exploraram a atividade de ADCC das células NK induzida pelo cetuximab contra o CCR: Chen et al. (2016) recorreu a modelos de xenoenxerto de CCR com várias expressões de EGFR, verificando que o cetuximab pode intensificar a atividade de ADCC das células NK podendo esta combinação ser uma imunoterapia potencial para os doentes com CCRm com expressão de EGFR[26]. Por sua vez, Veluchamy et al. (2016) comprovaram que é importante reforçar a imunoterapia com células NK através da combinação com cetuximab para doentes com CCRm RAS-mut (mutado) e BRAF-mut, desde que o EGFR seja positivo[27].

Maréchal et al. (2010) verificou que as células CD56+, principalmente as células NK, podem ser o principal efetor da atividade do cetuximab relacionada com a ADCC. A atividade de ADCC é mantida em doentes com CCR, mas diminui significativamente após a depleção das células CD56+. A avaliação das células CD56+ que se infiltram no CCR primário pode fornecer informação adicional ao *status* de KRAS na predição da resposta e na sobrevida livre de progressão (SLP) em doentes de CCRm tratados com quimioterapia de primeira linha baseada no cetuximab[10].

A ADCC é um mecanismo de ação importante do cetuximab e a mutação KRAS prejudica o efeito terapêutico exercido pela ADCC mediada por cetuximab. Nakadate et al. (2014) investigaram a ADCC mediada por cetuximab em dois pares de células de CCR isogénicas com ou sem mutação KRAS. Numa análise de ADCC, a lise de células alvo dependente de perforina não foi afetada pelo estado de mutação KRAS. Por outro lado, a ADCC independente de perforina foi observada apenas em células de CCR com KRAS-wt, mas não em células com KRAS-mut. Experiências de neutralização revelaram que a interação do ligando Fas-Fas (FasL) era responsável pela indução de apoptose e ADCC independente de perforina. Além disso, a presença de células efetoras claramente aumentou o efeito inibidor do crescimento do cetuximab apenas em células de CCR com KRAS-wt, mas não naquelas com KRAS-mut[14].

A sinalização KRAS induz a supressão da expressão de EGFR, prejudicando assim os mecanismos efetores mediados pelo Fc de EGFR-Abs, tornando as células tumorais KRAS-mut menos sensíveis a estes agentes terapêuticos. O KRAS também tornou as células tumorais menos responsivas aos mecanismos efetores mediados pelo Fc de EGFR-Abs tais como a citotoxicidade dependente do complemento (CDC) e a ADCC. A redução da atividade de CDC e ADCC pode estar ligada à expressão reduzida de EGFR em células com KRAS-

mut *versus* células KRAS-wt. Experiências de imuno-histoquímica também revelaram uma expressão de EGFR inferior em amostras de CCR com KRAS-mut *versus* KRAS-wt[15].

As mutações de KRAS foram identificadas como um forte preditor de resistência a terapias anti-EGFR. Além de inibir a via do EGFR, os mAbs anti-EGFR podem exercer efeitos antitumorais através da ADCC. Vários estudos focaram a relevância funcional dos SNPs dos genes que codificam os FcγRs para a ADCC mediada pelo cetuximab no CCR. Paez et al. (2010) investigaram a associação de polimorfismos FcγR e mutação KRAS com a resposta clínica de 104 doentes com CCRm refratário tratados com mAbs anti-EGFR. A mutação KRAS foi associada a menor taxa de resposta (P=0,035) e menor SLP (3 vs 7 meses, P=0,36). Os polimorfismos FcγRIIa-H131R e FcγRIIIa-V158F não mostraram associações estatisticamente significativas com o estado de resposta, SLP ou KRAS. O *status* KRAS (P=0,04) e a toxicidade cutânea (P=0,03) foram associados à taxa de resposta. A classificação de risco clínico (P=0,006) e a toxicidade cutânea (P<0,0001) são fatores de risco independentes para a SLP. Os polimorfismos FcγRIIa e FcγRIIIa não são úteis como marcadores moleculares para resposta clínica em doentes com CCRm. Até à data, a EORTC (Organização Europeia para a Investigação e Tratamento do Cancro) afirmou que a toxicidade da pele e o estado KRAS são os únicos biomarcadores fiáveis para identificar os doentes que beneficiariam com a terapêutica anti-EGFR[30].

Posteriormente, outros estudos vieram contradizer estas conclusões, pelo que parece ainda não existir consenso: doentes portadores dos alelos H 131H/H e 131H/R do FcγRIIa apresentaram ADCC significativamente mais elevada do que os doentes com os alelos 131R/R[31]. Já outro estudo indicou que não há associação com resposta e não foi identificada capacidade prognóstica para os polimorfismos FcγRIIa[9]. Estes dois estudos são, contudo, consensuais relativamente aos polimorfismos do FcγRIIIa, que foram significativamente associados à resposta à terapia anti-EGFR em doentes com CCR KRAS-wt. O prognóstico é particularmente desfavorável para doentes portadores do genótipo FcγRIIIa com o alelo 158F/F (mediana da SLP (V – valina, F - Fenilanalina) V/V, V/F, F/F: 18,2 vs 17,3 vs 9,4 meses). Assim, em doentes com CCRm, a presença de FcγRIIIa-F envolvido na atividade de ADCC, pode predizer resistência à terapia anti-EGFR e prognóstico desfavorável[9,31].

Existe uma relação entre as células iNKT, a atividade de ADCC, os genótipos em FCGR2A e FCGR3A e a eficácia do cetuximab em doentes com CCRm KRAS-wt. Lo Nigro et al. (2016) investigaram o papel prognóstico de células iNKT e ADCC em 41 doentes com CCRm KRAS-wt tratados com cetuximab, e demonstraram que doentes com atividade de ADCC acima do nível médio (71%) apresentaram uma melhoria da SG em comparação com os que tinham menor atividade de ADCC (16 vs 8 meses, P=0,026). Não se observou correlação significativa entre as células iNKT e a SG (P=0,19), mas a tendência de uma melhor

SG após dez meses em doentes com nível basal de células iNKT elevado (acima de 0,382 células/mL). Contudo, os doentes com elevada atividade de ADCC e grande quantidade de células iNKT apresentaram um efeito benéfico em comparação com a ADCC baixa e iNKT baixo. Este benefício parece superior ao papel da ADCC isolada, suportando a hipótese de uma interação positiva entre as células efetoras iNKT e a ADCC. A correlação da SG e da SLP com SNPs envolvidos na ADCC revelou-se não significativa[32].

Sconocchia et al. (2014), correlacionando os resultados de testes imuno-histoquímicos com a análise do curso clínico da doença, sugeriram existir evidência de que a infiltração de tumores colorretais por células NK e T CD8+ está associada a sobrevivência prolongada dos doentes, por interferirem no microambiente tumoral desencadeando respostas imunes antigénio-específicas. Além disso, a enumeração destas células nestes tumores pode fornecer informações de prognóstico úteis. Por outro lado, os tumores com infiltração de células NK em combinação com linfócitos T CD3+ e CD4+ não tiveram nenhum efeito detetável sobre o curso clínico da doença[33].

Estudos recentes evidenciaram que as células NK em doentes com cancro são disfuncionais e podem ser ainda mais após a quimioterapia, assim é crucial avaliar se as estratégias imunoterapêuticas destinadas a aumentar ainda mais a ADCC são viáveis. Contudo, um novo mAb anti-EGFR, o GA201, foi capaz de induzir ADCC em células NK de doentes com CCR, superando eficazmente a sua deficiência[8].

Foi desenvolvida uma abordagem de anticorpo sequencial contra neoplasias malignas que expressam EGFR que se dirige primeiro ao tumor e depois ao sistema imunitário. As células NK aumentam substancialmente a expressão da molécula co-estumuladora CD137 quando expostas a cetuximab em linhas celulares de CCR EGFR positivas. Além disto, a ativação de CD137 com um mAb agonista aumentou a desgranulação das células NK e a ADCC. A administração combinada de cetuximab e mAb anti-CD137 foi sinérgica e conduziu a uma resolução completa do tumor e aumento da SG, que dependia da presença de células NK. Nos doentes que receberam cetuximab, o nível de CD137 nas células NK circulantes e intratumorais dependia do tempo pós-cetuximab e do polimorfismo do FcyRIIIa. O aumento de células NK que expressam CD137 correlacionou-se diretamente com o aumento de células T CD8+ EGFR-específicas[18].

Outro estudo realça o potencial para sinalizar enzimas associadas à superfície celular, tais como catepsina S, como alvos terapêuticos, utilizando anticorpos capazes de induzir a ADCC em células tumorais. As enzimas proteolíticas têm sido implicadas na condução da progressão tumoral por meio da sua atividade no microambiente celular de cancro onde promovem proliferação, diferenciação, apoptose, migração e invasão. As estratégias

terapêuticas têm-se centrado na atenuação da sua atividade utilizando pequenos inibidores de moléculas, mas a associação de proteases com a superfície celular durante a progressão do cancro abre a possibilidade de direcionar estas a utilizar a ADCC. A catepsina S é uma cisteína protease lisossómica que promove o crescimento e a invasão de células tumorais e endoteliais durante a progressão do cancro. A análise das biópsias de doentes com CCR mostra que a catepsina S se associa com a membrana celular indicando um potencial para o direcionamento da ADCC. A catepsina S é expressa na superfície de células tumorais representativas de CCR (expressão positiva de 23%-79%). Além disso, a ligação de um novo anticorpo humanizado (Fsn0503h) à catepsina S associada à superfície resulta na morte de tumores sinalizados por células NK. Num modelo de CCR, Fsn0503h provoca um efeito citotóxico de 22%[34].

O antigénio carcino-embrionário (CEA) encontra-se associado a vários tipos de cancro, particularmente o CCR, e desenvolveu-se para ser um alvo molecular para diagnóstico e terapêutica do cancro. No estudo de Zheng et al. (2011), criou-se um novo mAb anti-CEACAM5, nomeadamente mAb CC4, por imunização de ratinhos com células vivas de CCR. Estudos imuno-histoquímicos descobriram que o mAb CC4 liga-se especificamente e fortemente aos tecidos tumorais, especialmente ao adenocarcinoma colorretal. Em ratinhos xeno-enxertados, o mAb CC4 é acumulado especificamente no local do tumor e reprime notavelmente o crescimento do tumor colorretal. A análise funcional *in vitro* mostrou que o mAb CC4 suprime significativamente a proliferação celular, a migração e a agregação de células de CCR e também aumenta fortemente a ADCC. O mAb CC4 é ainda capaz de aumentar a citotoxicidade das células NK contra células de CCR com défice de MHC de classe 1, bloqueando a interação intercelular entre o CEACAM5 epitelial e o recetor CEACAM1 inibidor de NK. Estes dados sugerem que o mAb CC4 tem o potencial de ser desenvolvido como um novo veículo de sinalização de tumor e auxiliar na terapia do cancro[35].

O efeito da glicoproteção de um antigénio específico de membrana CEA (CEACAM5) e anticorpo (PR1A3) sobre a capacidade para aumentar a morte de linhas celulares de CCR por células imunitárias efetoras foi avaliada no estudo de Ashraf et al. (2009). A eficácia *in vivo* do anticorpo também foi testada. A alteração resultante do padrão de glicosilação do segmento Fc aumenta a afinidade de ligação do anticorpo ao recetor FcγRIIIa em células imunitárias efetoras mas não altera a capacidade de ligação do anticorpo. A ADCC é inibida na presença de anticorpos bloqueadores anti-FcγRIII. Esta glicovariante de hPR1A3 aumenta a ADCC dez vezes em relação ao anticorpo não modificado, utilizando células do sangue periférico não fracionadas mononucleares ou NK e células de CCR positivas a CEA como alvos. As células NK são muito mais potentes na obtenção de ADCC do que monócitos ou granulócitos recém-isolados. A citometria de fluxo e a microscopia de fluorescência

automatizada têm sido utilizadas para mostrar que ambas as versões de hPR1A3 podem induzir fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP) por macrófagos derivados de monócitos. Contudo, o anticorpo glicovariante não mediou a ADCP aumentada. Isto pode ser explicado pela expressão relativamente baixa de FcγRIIIa em macrófagos cultivados. Estudos *in vivo* mostram a eficácia da IgG1 PR1A3 recombinante humana na melhoria significativa da sobrevivência num modelo murino de CCRm. A atividade de ADCC *in vitro* altamente aumentada da versão glicovariante de hPR1A3 é suscetível de ser clinicamente benéfica[36].

CONCLUSÕES

Apesar da existência de inúmeros estudos que avaliam o significado prognóstico de variáveis histológicas, moleculares e clínicas, o estadio patológico ao diagnóstico mantém-se como o principal indicador de prognóstico a longo-prazo. As características mais importantes são a presença de metástases à distância, extensão local do tumor, metastização ganglionar loco-regional e doença residual.

As células NK são consideradas os mediadores principais do efeito terapêutico do cetuximab devido à ADCC. O número de células iNKT e o nível de ADCC, exercida por células NK na presença de cetuximab, podem ser úteis marcadores prognósticos ou preditivos de resposta.

A pertinência deste estudo prende-se com o facto de estarmos numa era de imunoterapia no tratamento do CCR (e de outros tipos de cancro), em que o objetivo é cada vez mais potenciar os resultados da mesma. Assim sendo, o conhecimento acerca do papel da ADCC permite-nos equacionar se este poderá ser um bom marcador para a utilização conjunta ou sequencial de mAbs (cetuximab) e inibidores dos *checkpoints*, potenciando o melhor dos dois mundos.

Deste modo, este estudo torna-se relevante devido à atualidade do tema, a sistematização da informação disponível e a sua aplicabilidade na prática clínica na área da Oncologia Médica, repercutindo de alguma forma na terapêutica deste tipo de cancro e no prognóstico dos doentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2016) Cancer statistics. CA Cancer J Clin 66:7-30.

2. Miranda N, Portugal C, Nogueira PJ, et al. (2016) Doenças Oncológicas em Números – 2015. Direção Geral da Saúde.

3. Chu, E (2008) New Treatment strategies for metastatic colorectal cancer. CMP Healthcare Media, Manhasset, NY.

4. Carethers JM (2008) Systemic treatment of advanced colorectal cancer: tailoring therapy to the tumor. Therap Adv Gastroenterol 1(1):33-42.

5. Yalçin S (2009) The increasing role of pharmacogenetics in the treatment of gastrointestinal cancers. Gastrointest Cancer Res 3(5):197-203.

6. Peeters M, Price T (2012) Biologic therapies in the metastatic colorectal cancer treatment continuum-applying current evidence to clinical practice. Cancer Treat Rev 38:397-406.

7. Linardou H, Briasoulis E, Dahabreh IJ, et al. (2011) All about KRAS for clinical oncology practice: gene profile, clinical implications and laboratory recommendations for somatic mutational testing in colorectal cancer. Cancer Treat Rev 37:221-233.

8. Oppenheim DE, Spreafico R, Etuk A, et al. (2014) Glyco-engineered anti-EGFR mAb elicits ADCC by NK cells from colorectal cancer patients irrespective of chemotherapy. Br J Cancer 110(5):1221-7.

9. Calemma R, Ottaiano A, Trotta AM, et al. (2012) Fc gamma receptor IIIa polymorphisms in advanced colorectal cancer patients correlated with response to anti-EGFR antibodies and clinical outcome. J Transl MeD 10:232.

10. Maréchal R, De Schutter J, Nagy N, et al. (2010) Putative contribution of CD56 positive cells in cetuximab treatment efficacy in first-line metastatic colorectal cancer patients. BMC Cancer 10:340.

11. Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, et al. (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. Science 277:333-338.

12. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. (2013) Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. N Engl J Med 369:1023-1034.

13. Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, et al. (2014) FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet Oncol 15:1065-1075.

14. Nakadate Y, Kodera Y, Kitamura Y, et al. (2014) KRAS mutation confers resistance to antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against human colorectal cancer cells. Int J Cancer 134(9):2146-55.

15. Derer S, Berger S, Schlaeth M, et al. (2012) Oncogenic KRAS impairs EGFR antibodies efficiency by C/EBPβ-dependent suppression of EGFR expression. Neoplasia 14(3):190-205.

16. Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 26:1626-1634.

17. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, et al. (2009) Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med 360:1408-1417.

18. Kohrt HE, Colevas AD, Houot R, et al. (2014) Targeting CD137 enhances the efficacy of cetuximab. J Clin Invest 124(6):2668-82.

19. Iannello A, Ahmad A (2005) Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies. Cancer Metastasis Rev 24: 487-499.

20. Seo Y, Ishii Y, Ochiai H, et al. (2014) Cetuximabmediated ADCC activity is correlated with the cell surface expression level of EGFR but not with the KRAS/BRAF mutational status in colorectal cancer. Oncol Rep 31:2115-2122.

21. Taylor RJ, Chan SL, Wood A, et al. (2009) FcgammaRIIIa polymorphisms and cetuximab induced cytotoxicity in squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer Immunol Immunother 58: 997-1006

22. Mellor JD, Brown MP, Irving HR, et al. (2013) A critical review of the role of Fc gamma receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer. J Hematol Oncol 6:1.

23. Lo Nigro C, Ricci V, Vivenza D, et al. (2016) Prognostic and predictive biomarkers in metastatic colorectal cancer anti-EGFR therapy. World J Gastroenterol 22(30):6944-54.

24. Kjersem JB, Skovlund E, Ikdahl T, et al. (2014) FCGR2A and FCGR3A polymorphisms and clinical outcome in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line 5-fluorouracil/ folinic acid and oxaliplatin +/- cetuximab. BMC Cancer 14:340.

25. Yang Y, Guo Q, Xia M, et al. (2015) Generation and characterization of a target-selectively activated antibody against epidermal growth factor receptor with enhanced anti-tumor potency. MAbs 7(2):440-50.

26. Chen S, Li X, Chen R, et al. (2016) Cetuximab intensifies the ADCC activity of adoptive NK cells in a nude mouse colorectal cancer xenograft model. Oncol Lett. 12(3):1868-1876.

27. Veluchamy JP, Spanholtz J, Tordoir M, et al. (2016) Combination of NK Cells and Cetuximab to Enhance Anti-Tumor Responses in RAS Mutant Metastatic Colorectal Cancer. PLoS One 11(6):e0157830.

28. Kohrt HE, Houot R, Marabelle A, et al. (2012) Combination strategies to enhance antitumor ADCC. Immunotherapy 4:511-527.

29. Porcelli S, Yockey CE, Brenner MB, Balk SP (1993) Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. J Exp Med 178:1-16.

30. Paez D, Paré L, Espinosa I, et al. (2010) Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and KRAS mutations: are they useful biomarkers of clinical outcome in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR-based therapy? Cancer Sci 101(9):2048-53.

31. Trotta AM, Ottaiano A, Romano C, et al. (2016) Prospective Evaluation of Cetuximab-Mediated Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity in Metastatic Colorectal Cancer Patients Predicts Treatment Efficacy. Cancer Immunol Res. 4(4):366-74.

32. Lo Nigro C, Ricci V, Vivenza D, et al. (2016) Evaluation of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity activity and cetuximab response in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer patients. World J Gastrointest Oncol 8(2):222-230.

33. Sconocchia G, Eppenberger S, Spagnoli GC, et al. (2014) NK cells and T cells cooperate during the clinical course of colorectal cancer. Oncoimmunology 3(8):e952197.

34. Kwok HF, Buick RJ, Kuehn D, et al. (2011) Antibody targeting of Cathepsin S induces antibody-dependent cellular cytotoxicity. Mol Cancer 10:147.

35. Zheng C, Feng J, Lu D, et al. (2011) A novel anti-CEACAM5 monoclonal antibody, CC4, suppresses colorectal tumor growth and enhances NK cells-mediated tumor immunity. PLoS One 6(6):e21146.

36. Ashraf SQ, Umana P, Mössner E, et al. (2009) Humanised IgG1 antibody variants targeting membrane-bound carcinoembryonic antigen by antibody-dependent cellular cytotoxicity and phagocytosis. Br J Cancer 101(10):1758-68.