



Diana Filipa Lopes Ferreira Oliveira

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Imunoterapia Ativa para o cancro da mama: potenciais estratégias terapêuticas” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação do Dr. Nélio Oliveira e da Professora Doutora Alexandrina Ferreira Mendes e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Diana Filipa Lopes Ferreira Oliveira

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Imunoterapia Ativa para o cancro da mama: potenciais estratégias terapêuticas” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, do Dr. Nélio Oliveira e da Professora Doutora Alexandrina Ferreira Mendes e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Diana Filipa Lopes Ferreira Oliveira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2013145922, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Imunoterapia Ativa para o cancro da mama: potenciais estratégias terapêuticas” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito do âmbito da unidade de Estágio curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 7 de setembro de 2018.

Diana Filipa Lopes Ferreira Oliveira

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Anabela Mascarenhas, Diretora Técnica da Farmácia Saúde, por me ter recebido tão bem e por me ter dado a oportunidade de estagiar num local de excelência.

Ao Dr. Nélio Oliveira, Farmacêutico Substituto da Farmácia Saúde e meu orientador, pela disponibilidade, paciência e auxílio demonstrados ao longo do meu estágio.

À restante equipa da Farmácia Saúde, pela amizade que me transmitiram e por promoverem diariamente o profissionalismo e espírito de interajuda.

À Professora Doutora Alexandrina Ferreira Mendes, orientadora da minha monografia, pela compreensão e paciência demonstradas, e por toda a ajuda prestada na elaboração do presente trabalho.

Aos meus pais e irmã, pelo apoio incondicional ao longo do meu percurso académico, por me incentivarem e estarem presentes em todos os momentos.

Ao André, pelo apoio e carinho constantes, por estar sempre presente e por me levantar o ânimo nos momentos mais difíceis.

Aos amigos que Coimbra me deu, que me acompanharam e apoiaram sempre, e que tornaram estes 5 anos na melhor experiência universitária que podia ter vivido.

A todos, muito Obrigada

## ÍNDICE

<b>PARTE I: RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA</b> .....	<b>8</b>
<b>RESUMO/ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2. ANÁLISE SWOT</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1. PONTOS FORTES</b> .....	<b>13</b>
LOCALIZAÇÃO E POPULAÇÃO ABRANGIDA .....	13
PLANO DE ESTÁGIO.....	13
BALANÇO ENTRE AUTONOMIA E INTERAJUDA .....	14
EQUIPA TÉCNICA DA FARMÁCIA E GESTÃO DE RECURSO HUMANOS .....	15
INTERVENÇÃO FARMACÊUTICA E INTERAÇÃO COM O UTENTE.....	15
<b>2.2. PONTOS FRACOS</b> .....	<b>16</b>
PLANO CURRICULAR DO MICF .....	16
FONTES DE INFORMAÇÃO POUCO FIDEDIGNAS.....	17
VALIDAÇÃO DO RECEITUÁRIO MANUAL .....	18
<b>2.3. OPORTUNIDADES</b> .....	<b>18</b>
VALORIZAÇÃO PROFISSIONAL E FORMAÇÃO CONTÍNUA.....	18
INOVAÇÃO NOS SERVIÇOS FARMACÊUTICOS.....	19
<b>2.4. AMEAÇAS</b> .....	<b>20</b>
CONSTANTES ROTURAS DE STOCK .....	20
ESTABELECIMENTOS DE VENDA DE MNSRM.....	21
DIVERSIDADE DE PRODUTOS PARA O MESMO EFEITO .....	21
<b>3. CONCLUSÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>24</b>
<b>5. ANEXOS</b> .....	<b>25</b>
<b>ANEXO I – CASOS PRÁTICOS</b> .....	<b>25</b>
<b>ANEXO II – PREPARAÇÃO INDIVIDUALIZADA DA MEDICAÇÃO</b> .....	<b>27</b>

<b>PARTE II: IMUNOTERAPIA ATIVA PARA O CANCRO DA MAMA: POTENCIAIS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS</b> .....	<b>28</b>
<b>RESUMO/ABSTRACT</b> .....	<b>29</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>31</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>2. FISIOPATOLOGIA DO CANCRO DA MAMA</b> .....	<b>34</b>
<b>3. CLASSIFICAÇÃO DO CANCRO DA MAMA</b> .....	<b>35</b>
3.1. CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA.....	35
3.2. CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR .....	35
<b>4. IMUNOEDIÇÃO E IMUNOVIGILÂNCIA: MICROAMBIENTE TUMORAL</b> ...	<b>37</b>
<b>5. IMUNOTERAPIA</b> .....	<b>38</b>
5.1. IMUNOTERAPIA PASSIVA NO CANCRO DA MAMA.....	39
5.2. NECESSIDADE DE NOVAS TERAPÊUTICAS.....	40
5.3. IMUNOTERAPIA ATIVA NO CANCRO DA MAMA.....	41
5.3.1.1. IMUNOTERAPIA ATIVA DIRIGIDA AO MICROAMBIENTE TUMORAL.....	42
5.3.1.1.1. INIBIDORES DOS CHECKPOINTS IMUNES.....	42
5.3.1.1.2. CITOCINAS IMUNOMODULADORAS .....	43
5.3.2. IMUNOTERAPIA ATIVA DIRIGIDA AO TUMOR: VACINAS TERAPÊUTICAS.....	43
5.3.2.1. SELEÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE ANTIGÉNIOS TUMORAIS .....	45
5.3.2.2. ANTIGÉNIOS <i>CANCER-TESTIS</i> .....	45
5.3.2.3. ANTIGÉNIOS ASSOCIADOS AO CANCRO DA MAMA .....	46
Antigénio HER2 .....	46
Antigénio MUC1 .....	46
NEOANTIGÉNIOS .....	47
<b>5.4. VACINAS TERAPÊUTICAS PARA O CANCRO DA MAMA</b> .....	<b>47</b>
5.4.1. DESENVOLVIMENTO DE VACINAS.....	48
5.4.2. SISTEMAS DE ENTREGA DE VACINAS .....	49
5.4.2.1. VACINAS DE DNA/RNA .....	49
5.4.2.2. VACINAS À BASE DE CÉLULAS TUMORAIS .....	49
5.4.2.3. VACINAS À BASE DE PEPTÍDEOS.....	50
Vacinas Peptídicas derivadas do HER2.....	51
Vacinas Peptídicas derivadas da MUC1 .....	51
Vacina peptídica sTn-KLH .....	52
5.4.2.4. VACINAS À BASE DE CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	52
5.4.2.4.1. MODIFICAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	53
EXPOSIÇÃO A ANTIGÉNIOS TUMORAIS.....	53
TERAPIA GÉNICA .....	53

5.4.3. APRESENTAÇÃO DE ESTUDOS DE EFICÁCIA .....	54
5.4.3.1. ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS.....	54
VACINAS PEPTÍDICAS.....	54
VACINAS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	54
5.4.3.2. ENSAIOS CLÍNICOS .....	55
VACINAS PETÍDICAS.....	55
VACINAS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS .....	57
5.5. COMBINAÇÃO DE TERAPIAS: O FUTURO .....	57
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>63</b>

# PARTE I

## RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

Orientado pelo Dr. Nélio Filipe Gomes de Oliveira



## **RESUMO**

O estágio curricular é a etapa final do nosso percurso académico enquanto estudantes de Ciências Farmacêuticas, constituindo um elo de ligação entre a realidade académica e profissional. Este é o primeiro contacto com o mundo do trabalho, onde o estudante pode aplicar, num contexto de prática profissional, os conhecimentos adquiridos ao longo da sua formação. Neste sentido, realizei o estágio em farmácia comunitária na Farmácia Saúde, onde experienciei o papel do farmacêutico como profissional de saúde. O presente relatório foi baseado numa análise SWOT do estágio realizado evidenciando, de forma estruturada e retrospectiva, os pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças identificadas ao longo do percurso.

**Palavras-chave:** Estágio Curricular; Farmácia Comunitária; Farmácia Saúde; Análise SWOT.

## **ABSTRACT**

The curricular internship is the final stage of our academic course as students, representing the connection between the professional and academic reality. This is the first contact with the working reality, where the student can apply the knowledge acquired along the academic training. In this regard, I carried out my community pharmacy internship at Farmácia Saúde, where I experienced the role of the pharmacist as a healthcare professional. The present report was based on a structured and retrospective SWOT analysis of the internship, in way to evidence the strengths, weaknesses, opportunities and threats identified along the way.

**Keywords:** Curricular Internship; Community Pharmacy; Farmácia Saúde; SWOT Analysis.

## **ABREVIATURAS**

**COE** - Contraceção Oral de Emergência

**DCI** - Denominação Comum Internacional

**MICF** - Mestrado Integrado em Ciência Farmacêuticas

**MNSRM** - Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

**MSRM** - Medicamento Sujeito a Receita Médica

**SNS** - Sistema Nacional de Saúde

**SWOT** - *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats* (Pontos Fortes, Pontos Fracos, Oportunidades e Ameaças)

## I. INTRODUÇÃO

O atual plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, engloba a realização de um Estágio Curricular em Farmácia Comunitária, cujo objetivo é a consolidação e aplicação dos conhecimentos adquiridos num contexto de prática profissional.

Esta fase final funciona como elo de ligação entre as duas componentes, prática e teórica, durante a qual o estudante tem a oportunidade de contactar com a realidade profissional antes de entrar no mercado de trabalho. Assim, considero a realização do estágio como ponto de partida para a nossa vida futura, no sentido em que nos permite experienciar a realidade do exercício da profissão farmacêutica, de forma a direcionar os nossos objetivos futuros de acordo com aquilo que nos desperta mais interesse.

O presente relatório diz respeito às atividades realizadas durante o estágio, bem como à aprendizagem resultante do mesmo, sendo apresentado sob a forma de análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*). O local que escolhi para a realização do estágio curricular foi a Farmácia Saúde, na Figueira da Foz, onde estagiei entre fevereiro e maio de 2018, sob a orientação do Farmacêutico Substituto, Dr. Nélcio Oliveira. Este período, foi sem dúvida, uma oportunidade única para crescer enquanto estudante e futura farmacêutica, durante o qual compreendi a importância da intervenção farmacêutica e do papel do farmacêutico como agente de saúde pública.

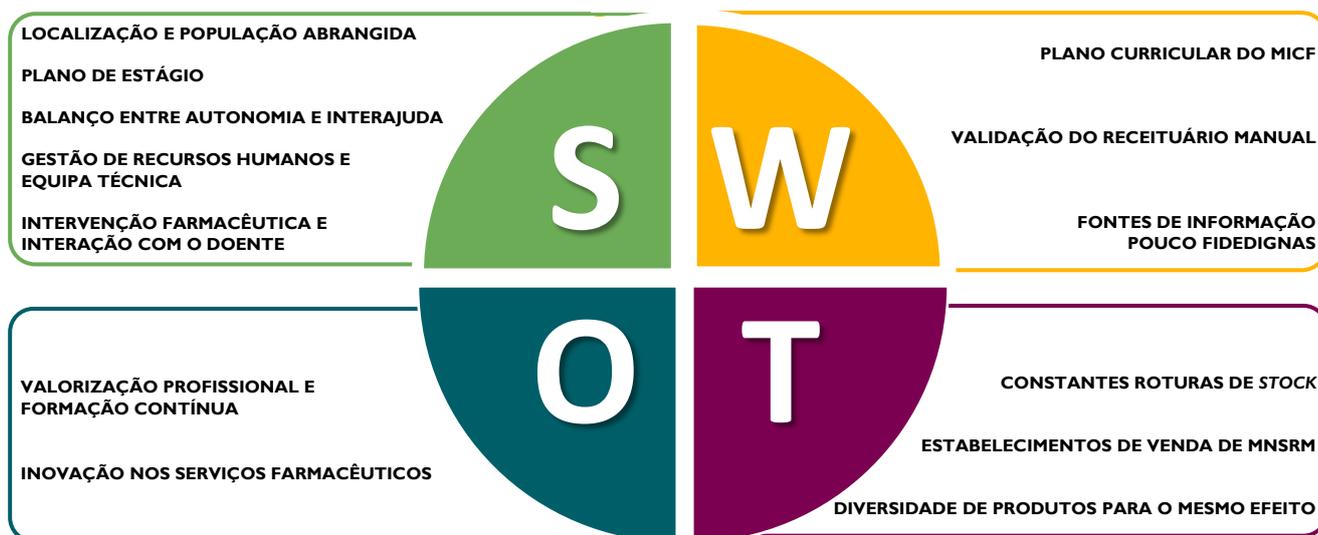
## 2. ANÁLISE SWOT

A análise SWOT é uma ferramenta de análise estratégica, que pode ser utilizada num contexto de autoavaliação, permitindo perceber as nossas próprias forças e fraquezas e as oportunidades e ameaças que possam surgir do nosso perfil ou do meio envolvente. A adaptação desta metodologia ao contexto pessoal, mais concretamente ao percurso do estágio, permite-nos identificar, de uma forma mais sucinta e estruturada, as nossas características pessoais e as do ambiente de trabalho em que nos inserimos, focando os aspetos mais relevantes da nossa experiência. (MANKTELOW *et al.*)

Assim, a análise que se segue, baseada neste modelo, corresponde ao estágio curricular realizado na Farmácia Saúde, onde referencio, de uma forma crítica e contextualizada, os aspetos que mais valorizei durante o mesmo (Pontos Fortes), bem como as dificuldades experienciadas (Pontos Fracos) e Oportunidades e Ameaças que identifiquei.

Esta análise retrospectiva e observacional está focada na minha opinião pessoal sobre o decorrer do estágio, nomeadamente na forma como este me permitiu aplicar os conhecimentos adquiridos ao longo do percurso académico, num contexto simulado de prática profissional.

**TABELA I:** Análise SWOT do estágio realizado em farmácia comunitária.



## **2.1. PONTOS FORTES**

---

### **LOCALIZAÇÃO E POPULAÇÃO ABRANGIDA**

A Farmácia Saúde é um local de excelência para a realização do estágio curricular por diversos motivos, dos quais destaco a localização privilegiada no centro comercial E. LECLERC e a heterogeneidade dos seus utentes. O facto de as suas instalações se situarem num centro comercial proporciona uma boa acessibilidade e comodidade aos utentes, em termos de facilidade de acesso, estacionamento disponível e horário alargado da farmácia.

A localização estratégica da farmácia permite uma grande afluência de utentes, das mais variadas faixas etárias e estratos socioeconómicos. Assim, não é possível definir um cliente-tipo da farmácia, uma vez que para além dos utentes habituais, maioritariamente idosos, também é comum contactar com utentes esporádicos vindos, principalmente, do centro comercial, e com turistas de ocasião, visto que a Figueira da Foz é uma cidade turística.

Esta heterogeneidade da população abrangida é, sem dúvida, desafiante durante o atendimento ao balcão, uma vez que requer uma personalização do atendimento e adaptação do discurso, consoante o utente que temos perante nós. De facto, esta foi uma das razões pela qual escolhi a Farmácia Saúde para a realização do meu estágio, uma vez que considero este contexto como uma ferramenta de aprendizagem que nos permite contactar com diversas situações, requerendo assim uma maior preparação a nível pessoal e profissional.

### **PLANO DE ESTÁGIO**

O meu estágio na Farmácia Saúde seguiu um plano lógico e estruturado, que me permitiu uma familiarização e aprendizagem gradual da organização do espaço farmácia e das funções desempenhadas pelo farmacêutico. Desta forma, o estágio consistiu essencialmente em três fases distintas, passando por uma fase inicial de *back office*, seguida de um período de transição para o *front office* de acompanhamento de atendimentos que, por fim, culminou numa fase de atuação mais autónoma de atendimento ao balcão.

Durante o primeiro mês desempenhei essencialmente funções no *back office*, o que me permitiu uma ambientação progressiva à organização e funcionamento geral da farmácia, dado que as minhas funções passaram pela gestão de encomendas e devoluções, armazenamento de medicamentos e outros produtos de farmácia, reposição de produtos, gestão de stock e prazos de validade, e ainda receção de reservas. Esta fase inicial de adaptação é crucial para um bom desempenho a nível do *front office*, uma vez que permite um contacto inicial com os

produtos existentes na farmácia, a associação de marca e Denominação Comum Internacional (DCI) e a consciencialização da disposição dos produtos no espaço da farmácia.

Seguiu-se a fase de transição para o *front office*, em que passei a assistir aos atendimentos realizados por farmacêuticos, como que uma espécie de “sombra”, onde pude iniciar o contacto direto com o utente e adquirir conhecimentos quanto ao aconselhamento farmacêutico. Esta fase foi essencial para o meu desempenho posterior, uma vez que me permitiu a adaptação ao funcionamento sistema informático *Sifarma 2000*<sup>®</sup>, resultando numa maior agilidade durante o processo de atendimento e dispensa ao utente. Tive ainda oportunidade de realizar a medição de parâmetros bioquímicos e da pressão arterial, iniciando a minha intervenção farmacêutica gradualmente, através da interpretação dos resultados e aconselhamento de medidas não farmacológicas.

Todo este período de adaptação resultou numa preparação consistente e fundamentada para a fase de atendimento ao balcão. Através da sistematização dos procedimentos informáticos e aquisição de conhecimentos técnico-científicos, adquiri destreza e segurança necessárias para proceder ao atendimento ao público. Além disso, a ajuda e disponibilidade constante de todos os profissionais da equipa permitiram-me ganhar a confiança e autonomia necessárias a um bom atendimento.

Em suma, este plano de estágio permitiu-me adquirir as capacidades necessárias para prestar um bom atendimento e aconselhamento, sempre focado do doente e nas suas necessidades, objetivo final da ação farmacêutica.

## **BALANÇO ENTRE AUTONOMIA E INTERAJUDA**

A equipa da Farmácia Saúde é constituída por profissionais de excelência, cujas características pessoais e técnico-científicas individuais proporcionam um ambiente de trabalho distinto para a realização de um estágio curricular onde o dinamismo, profissionalismo e espírito de interajuda imperam diariamente.

Ao longo de todo o meu estágio a disponibilidade demonstrada pelos elementos da equipa, para o ensino e esclarecimento de dúvidas, foi constante. Apesar de a autonomia ser uma das máximas encorajadas durante o estágio, é importante para nós estagiários sabermos que temos uma equipa à nossa disposição, que nos auxilia perante as dificuldades emergentes.

Contudo, na minha opinião, deve existir sempre um balanço entre a independência dada ao estagiário e a ajuda prestada ao mesmo, no sentido de encorajar a autoaprendizagem e raciocínio próprio. Isto é, o estagiário deve ser autónomo o suficiente para resolver os

problemas por si, com base nos seus conhecimentos e capacidades, sem que recorra constantemente à ajuda de outro profissional. Só assim é possível incentivar à aprendizagem e autonomia, sendo este balanço é perfeitamente conseguido na Farmácia Saúde, constituindo outro dos pontos fortes do meu estágio.

## **EQUIPA TÉCNICA DA FARMÁCIA E GESTÃO DE RECURSO HUMANOS**

Na Farmácia Saúde, a gestão dos recursos humanos é feita de forma a que as diferentes áreas de atuação da farmácia sejam da responsabilidade elementos específicos, o que permite a otimização do funcionamento da farmácia. Desta forma, a receção e gestão de encomendas, conferência do receituário manual, preparação de manipulados no laboratório, elaboração da preparação individualizada da medicação, gestão das linhas de cosmética, veterinária, puericultura e ortopedia, e o acompanhamento farmacoterapêutico, estão ao cargo de determinados elementos da equipa.

Esta delegação de responsabilidades permite um maior foco e especialização destes profissionais numa determinada área, o que não invalida o conhecimento de todas elas pelos restantes elementos. Pelo contrário, esta é uma mais-valia, no sentido em que na presença de dúvidas mais específicas e complexas, esse profissional acaba por ser uma referência para a resolução das mesmas.

Assim, este método de gestão permitiu-me aprofundar os meus conhecimentos nas diferentes áreas, através de explicações mais detalhadas sobre cada uma delas, contribuindo também para uma integração na equipa de trabalho mais facilitada e natural.

## **INTERVENÇÃO FARMACÊUTICA E INTERAÇÃO COM O UTENTE**

O atendimento ao público, durante o meu estágio curricular, permitiu-me interagir com os utentes da farmácia, contactar com as mais diversas situações e proceder à sua resolução através do aconselhamento e intervenção farmacêutica.

Para mim, esta foi a fase mais gratificante e que me permitiu crescer mais enquanto estagiária, tanto a nível profissional como pessoal. Aqui, é onde colocamos em prática o nosso conhecimento teórico, adquirido ao longo dos 5 anos de MICEF, e onde adquirimos capacidades de comunicação e destreza para proceder a um bom aconselhamento. É necessário ouvir utente, recolher e processar toda a informação, e transmitir-lhe o nosso conselho de forma clara, compreensível e completa, assumindo uma postura e um discurso adaptado à circunstância em questão. Este processo de interação com o utente é, sem dúvida, desafiante e exigente, requerendo muito foco e uma boa capacidade de resolução dos problemas. No

entanto é também um processo compensador quando vemos que a nossa intervenção contribui para o seu bem-estar da pessoa em questão.

A intervenção farmacêutica é, desta forma, crucial para a promoção de uma boa adesão à terapêutica, através do esclarecimento relativo ao plano farmacoterapêutico do utente, e para que o processo de automedicação seja feito de forma instruída e fundamentada, através da indicação farmacêutica e promoção do uso correto e racional do medicamento. Este processo de automedicação ocorre quando o utente, por sua iniciativa própria ou por influência de outros, decide usar um medicamento para alívio ou tratamento de queixas autovalorizadas. (Cruz *et al.*, 2015) Atualmente, está essencialmente associado ao uso de Medicamentos Não Sujeitos Receita Médica (MNSRM) e é principalmente aqui que o farmacêutico pode intervir e beneficiar o utente através do seu aconselhamento. Considero que este foi um dos pontos mais fortes do meu estágio, uma vez que me permitiu aplicar os meus conhecimentos, saber quais as questões-tipo a colocar ao utente com vista a entender melhor o problema exposto, e aconselhar o utente devidamente, como evidencio no caso prático I, do **Anexo I**.

## **2.2. PONTOS FRACOS**

---

### **PLANO CURRICULAR DO MIFC**

O atual conteúdo programático do plano curricular do MIFC abrange, na minha opinião, todas as áreas essenciais necessárias ao exercício profissional do farmacêutico. Contudo, considero que existem dois pontos fracos que têm um impacto negativo no nosso desempenho ao longo do estágio, pelo que devem ser tomados em consideração: (i) a existência de lacunas em determinadas áreas científicas do saber, das quais destaco a Veterinária, Dermofarmácia e Cosmética, Puericultura e Suplementação alimentar, e (ii) a falta de uma componente de prática profissional, ao longo do curso.

De facto, deveria ser considerada uma reformulação do conteúdo de algumas unidades curriculares, das quais destaco a de Preparações de Uso Veterinário (PUV), focada essencialmente nos métodos de desparasitação animal - tema bastante pertinente no contexto prático -, deixando por explorar conceitos tão importantes como as doenças mais comuns que afetam os animais. Seria também relevante complementar o conteúdo da unidade de Dermofarmácia e Cosmética, pois é necessário um maior foco nos diferentes produtos e gamas de cosmética existentes em farmácia, e, na minha opinião, também na área capilar, abordando temáticas como, por exemplo, a alopecia, uma problemática recorrente nas farmácias. Considero também que a unidade de Nutrição Humana deveria abordar, de forma

geral, os principais suplementos alimentares requisitados na farmácia, em função das principais queixas transversais à população (fadiga, falta de concentração, falta de apetite, entre outras). Por fim, temas como a Puericultura e Ortopedia, deveriam também ser abordados ao longo do plano curricular, uma vez que são requisitos comuns dos utentes das farmácias.

Finalmente, considero que deveria existir, durante o curso, uma componente de prática em farmácia comunitária, de caráter obrigatório, uma vez que esta é uma das áreas com mais saída profissional e pela qual todos os estudantes passam obrigatoriamente, mesmo que seja apenas durante o estágio curricular. O período de adaptação (no meu caso de um mês) é insuficiente para nos familiarizarmos com a imensidão de MNSRM e produtos de venda livre existentes no mercado, o que se reflete na nossa capacidade de aconselhamento ao utente.

### **FONTES DE INFORMAÇÃO POUCO FIDEDIGNAS**

Atualmente, é evidente que a população está cada vez mais informada sobre a sua saúde e bem-estar, resultado de uma maior preocupação por parte do utente e facilidade de acesso à informação. Contudo, a informação transmitida nos *media*, redes sociais e através da partilha de experiências pessoais pode ser contraditória e pouco fidedigna. Assim, é comum encontrar utentes na farmácia que questionam o nosso aconselhamento ou o porquê de não fazermos a cedência de determinados MSRMs, não compreendendo a importância deste assunto.

Esta foi, infelizmente, uma situação frequente ao longo do meu estágio, especialmente no que toca a certos fármacos para o alívio de situações agudas de dor ou inflamação, onde destaco a requisição de Ibuprofeno 600 mg ou de antibióticos sem receita médica, por exemplo para infeções urinárias. É difícil explicar a alguns utentes que este tipo de medicação não pode ser cedido sem haver um diagnóstico prévio de um médico. Muitas vezes o utente faz um “autodiagnóstico”, através da associação de sinais e sintomas a situações prévias, e da informação a que têm acesso, acreditando que o tratamento deverá ser o mesmo, para alcançar as melhorias observadas.

Foram várias as situações deste âmbito com que me deparei ao longo do estágio, o que considero um ponto fraco na medida em que se sente uma descredibilização do papel do farmacêutico no momento do aconselhamento, pois alguns utentes que não compreendem as nossas preocupações, não aceitando a nossa posição.

## **VALIDAÇÃO DO RECEITUÁRIO MANUAL**

Atualmente, a maioria das prescrições são receitas eletrônicas desmaterializadas, o que diminui a probabilidade de ocorrência de erros aquando a dispensa do medicamento, permitindo uma agilização deste processo e um maior foco do farmacêutico no aconselhamento, em vez de nos pormenores inerentes às receitas manuais. Contudo, continua a existir uma grande utilização destas, seja por ocorrência de falência informática, inadaptação do prescriptor, prescrição ao domicílio ou por utilização de um número inferior a 40 receitas médicas por mês. Estas exceções devem ser sempre verificadas previamente ao momento de dispensa, bem como todas as outras especificidades associadas às receitas manuais: a existência de um número máximo de 4 medicamentos por cada receita e de apenas 2 por cada linha, a validade não superior a 30 dias, a presença de vinheta do médico, de assinatura do prescriptor e da informação completa do utente, que inclui o nome, número do número do Sistema Nacional de Saúde (SNS), e quando aplicável, regime de comparticipação.

A verificação de todos estes parâmetros, associada à interpretação da caligrafia do prescriptor e identificação de determinados descontos, portarias e regimes de comparticipação especiais que possam existir, dificultam o processo de atendimento, havendo uma maior suscetibilidade para a ocorrência de erros. As minhas dificuldades refletiram-se essencialmente na associação dos regimes de comparticipação, complementares à comparticipação atribuída pelo Estado, uma vez que não contactamos ao longo da nossa formação académica, com a enorme variedade de planos existentes, nem com o procedimento a seguir nestas situações. Além disso, uma vez que não existe verificação pelo sistema informático, as receitas manuais requerem uma atenção redobrada, de forma a que seja dispensado o medicamento correto, o número de embalagens prescrito, com o devido desconto associado.

### **2.3. OPORTUNIDADES**

---

#### **VALORIZAÇÃO PROFISSIONAL E FORMAÇÃO CONTÍNUA**

O farmacêutico deve apostar na constante valorização profissional, uma vez que na área de saúde e farmácia comunitária é crucial estar atualizado quanto aos avanços em determinadas áreas da terapêutica e quanto às inovações que surgem no mercado. Na Farmácia Saúde, esta vertente é muito valorizada, havendo um enorme estímulo à participação dos estagiários e da equipa nas formações.

Assim, foi-me dada a oportunidade de participar em várias formações ao longo do estágio, onde pude aprofundar os meus conhecimentos em diversas áreas, como em (i) dermocosmética, através de formações sobre as linhas de proteção solar da ISDIN® e sobre

as novidades nas gamas de antienvhecimento da marca Lierac<sup>®</sup>, (ii) suplementação alimentar, através de uma formação de Nutrição Desportiva da marca ViV Sport<sup>®</sup>, e ainda sobre (iii) MNSRM, numa formação dos laboratórios Edol<sup>®</sup> sobre a Síndrome do Olho Seco.

Na minha opinião, estas formações são particularmente vantajosas na área da dermocosmética, uma vez que nos permitem conhecer melhor as diferentes gamas das marcas e entender o seu seccionamento, identificando mais facilmente qual o produto adequado às necessidades do utente. De facto, passado pouco tempo da participação na formação da ISDIN<sup>®</sup>, surgiu uma situação na qual pude aplicar os conhecimentos adquiridos, como evidencio no caso prático II, do **Anexo I**.

Um aconselhamento sólido, que transpareça que conhecemos as características e benefícios intrínsecos aos produtos, é essencial para a credibilidade e confiança que o utente deposita em nós. Assim, considero que a formação contínua é algo em que todos os farmacêuticos devem apostar, pois só com um conhecimento fundamentado e atualizado é possível prestar de um serviço de qualidade, sendo que esta oportunidade contribuiu de forma muito positiva para o meu desempenho no estágio.

## **INOVAÇÃO NOS SERVIÇOS FARMACÊUTICOS**

A Farmácia Saúde é uma das farmácias pioneiras na prestação de cuidados de saúde em farmácia comunitária, apostando em serviços farmacêuticos diferenciadores dos quais destaco as consultas de acompanhamento farmacoterapêutico, a preparação de medicamentos manipulados, a preparação individualizada da medicação e, mais recentemente, a integração do projeto-piloto USFarmácia.

As consultas de acompanhamento farmacoterapêutico são apenas realizadas pela Diretora Técnica e por outra farmacêutica especializada para tal, contudo, cabe a qualquer elemento da equipa identificar e avaliar situações suscetíveis de serem encaminhadas para este serviço, que considero uma mais-valia para o utente. A preparação de medicamentos manipulados é também realizada por uma farmacêutica especializada, sendo um serviço muito requisitado na Farmácia Saúde, que dá resposta às necessidades de personalização da terapêutica, quando não estão disponíveis comercialmente certas formulações ou associações de fármacos.

A preparação individualizada da medicação, exemplificada no **Anexo II**, foi um dos serviços com que pude contactar regularmente ao longo do meu estágio, auxiliando na execução do mesmo, o qual considero uma enorme vantagem para os utentes que perdem a capacidade de gerir a toma da medicação de acordo com a posologia indicada. Esta situação,

quando não identificada, pode tornar-se perigosa para o próprio utente, uma vez que a toma incorreta da medicação pode resultar em reações adversas ou no agravamento dos seus problemas de saúde. Assim, a preparação de dispensadores semanais permite ao utente uma gestão mais facilitada da sua medicação diária.

Por fim, não poderia deixar de mencionar o projeto-piloto USFarmácia, no qual a Farmácia Saúde está integrada. Este projeto surgiu da colaboração entre a Unidade de Saúde Familiar (USF) de São Julião e sete farmácias da Figueira da Foz e baseia-se numa rede de partilha de informação de saúde, sobre o risco cardiovascular e hipertensão e/ou dislipidemia, permitindo o desenvolvimento de um círculo de cuidados centrado no doente. Aqui, pretende-se que haja uma otimização do diálogo entre profissionais de saúde, através do registo dos procedimentos realizados na farmácia e no hospital, permitindo um melhor acompanhamento e controlo da doença do utente. O objetivo final é que o doente faça uma utilização mais racional do medicamento e promover a adesão à terapêutica e a prática de hábitos saudáveis. (Balasteiro, 2016) Apesar de apenas ter contactado com a fase inicial de recrutamento dos utentes para o projeto, podendo este ser feito apenas por um farmacêutico, considero que este projeto é altamente vantajoso para os utentes que o integram e um passo em frente na melhoria da comunicação entre profissionais de saúde.

Concluindo, considero os serviços referenciados acima simultaneamente como um ponto forte do meu estágio e uma oportunidade, pois apesar de não ter contactado diretamente com todos eles, foram, sem-dúvida, uma mais valia para a minha formação enquanto farmacêutica. Além disso, considero-os uma oportunidade a explorar no contexto de farmácia comunitária, uma vez que é necessário apostar nestes serviços diferenciadores não só pelos múltiplos benefícios que estes trazem para a vida do utente, mas também pela importância da posição do farmacêutico enquanto agente de saúde pública

## **2.4. AMEAÇAS**

---

### **CONSTANTES ROTURAS DE STOCK**

Durante o meu estágio, foi frequente a ocorrência de roturas de stock de determinados medicamentos, a nível nacional, nos laboratórios e armazenistas da farmácia. Esta situação é uma ameaça à atuação do farmacêutico, na medida em que muitas vezes não temos justificação para dar ao utente, nem uma previsão de quando é que o medicamento volta a estar disponível. Muitos utentes não entendem que esta é uma situação que nos transcende enquanto farmácia, acabando por nos associar à causa do problema, o que se torna numa situação ingrata para ambas as partes.

Contudo, perante esta situação, a nossa atuação passa sempre por contactar todos os armazenistas, e até mesmo outras farmácias, para averiguar a disponibilidade do produto pretendido pelo utente. Aconteceu até elaborarmos listas de espera para o produto FreeStyle Libre, um novo sensor de monitorização da glicose que esteve indisponível no mercado durante muito tempo. Esta foi, sem dúvida, uma ameaça para o meu desempenho enquanto estagiária, uma vez que tornou certos atendimentos mais morosos e que colocou em causa a minha capacidade de resolução dos problemas perante os utentes.

## **ESTABELECIMENTOS DE VENDA DE MNSRM**

A existência de estabelecimentos de venda de MNSRM, as parafarmácias, é, na minha opinião, uma enorme ameaça ao papel do farmacêutico e, conseqüentemente, do estagiário. Muitas vezes, os utentes questionam as diferenças de preço existentes entre estabelecimentos, considerando esse como o único fator importante na compra do medicamento, descurando a importância do aconselhamento farmacêutico a que têm acesso na farmácia. Além disto, o facto de muitos MNSRM serem publicitados nos *media* leva a que os utentes adquiram ideias distorcidas e estereotipadas sobre estes medicamentos, o que nem sempre ajuda ao esclarecimento das características do produto.

Assim, cabe ao farmacêutico lutar contra esta realidade, tentando afirmar cada vez mais a importância da sua intervenção, através de um aconselhamento fundamentado e de qualidade, conquistando assim o reconhecimento dos utentes.

## **DIVERSIDADE DE PRODUTOS PARA O MESMO EFEITO**

A grande diversidade de produtos de saúde para o mesmo efeito, existentes na farmácia comunitária, torna-se uma ameaça para o desempenho do farmacêutico e, em especial, do estagiário, que se encontra menos familiarizado com os mesmos.

É da responsabilidade do farmacêutico manter uma atualização contínua dos seus conhecimentos, de modo a prestar um serviço de qualidade de indicação farmacêutica. Contudo torna-se desafiante estar a par da imensidão de produtos de saúde e MNSRM existentes na farmácia, sendo que é frequente existirem vários para o mesmo efeito. Como são produtos de marcas comerciais, não são identificados por DCI, o que dificulta ainda mais a associação. Como consequência, pode ocorrer a descredibilização do estagiário perante o utente, uma vez que as semelhanças entre os diferentes produtos dificultam um aconselhamento bem fundamentado. Deparei-me com estas dificuldades especialmente nos MNSRM e nas gamas de cosmética, uma vez que há uma grande semelhança entre gamas de

marcas diferentes e mesmo dentro da própria marca. Muitas delas são direcionadas para o mesmo problema dermatológico, havendo apenas algumas diferenças na formulação.

Desta forma, e como já referi anteriormente, considero que a existência de uma componente prática de índole obrigatório, ao longo do plano curricular de MICE, poderia ajudar a colmatar estas dificuldades, através de um contacto prévio com as marcas comerciais comuns em farmácia, preparando-nos assim para um estágio curricular mais proveitoso.

### **3. CONCLUSÃO**

No fim desta jornada como estagiária, e fazendo um balanço geral do estágio curricular realizado na Farmácia Saúde, concluo que este foi um ponto fulcral na minha preparação para o futuro profissional.

Foi o culminar de 5 anos de formação académica, onde pude aplicar os conhecimentos técnico-científicos adquiridos e melhorar as minhas capacidades de comunicação e interação social. É verdade que o curso nos fornece todas as bases teóricas necessárias para o exercício da profissão, no entanto, a aprendizagem ao longo do estágio é tão ou mais necessária para a prestação de um serviço de qualidade, sendo que este passa não só pela qualidade do aconselhamento em termos científicos mas também por uma comunicação otimizada e uma proximidade dos utentes. Esta vertente humanística e pessoal da nossa profissão é, para mim, a parte mais gratificante. Saber que marcamos diariamente a diferença na vida dos nossos utentes, que contribuímos para o seu bem-estar e que somos valorizados por isso é muito compensador.

No entanto, ainda há um longo caminho a percorrer quanto à valorização do papel do farmacêutico no sistema de saúde atual, no qual o doente tem de estar sempre em primeiro lugar, no centro. Para isto, é essencial a otimização da comunicação interprofissional, processo no qual a Farmácia Saúde sempre foi pioneira. O farmacêutico é um agente de saúde pública, especialista do medicamento, que tem um grande impacto na qualidade de vida dos utentes, e cujo valor deve e tem de ser reconhecido.

Posso afirmar que estou preparada para enveredar no mundo profissional. Sinto-me realizada e motivada para o fazer, principalmente devido ao local onde estagiei, por ser tão completo em termos profissionais e me permitir evoluir diariamente. Acredito que o papel do farmacêutico faz a diferença, e sinto que a formação teórica do MICF a par da preparação prática do estágio, me deu as ferramentas necessárias para proceder a um aconselhamento farmacêutico de qualidade, para desempenhar um serviço farmacêutico de excelência.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALASTEIRO S. – **O Farol de São Julião**. 2016 [Acedido a 15 de maio de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.revistasauda.pt/noticias/Pages/O-farol-de-S--Juliao.aspx>
- COSTA A. R., MARTINS I., PALMA F., SOUSA F., ALMEIDA M. C., BOMBAS T. - **Guia Prático Contraceção de Emergência (CE)**. Sociedade Portuguesa da Contraceção. [Acedido a 12 de maio de 2018] Disponível na Internet: [https://www.spdc.pt/files/CE\\_Guia\\_prtico\\_final.pdf](https://www.spdc.pt/files/CE_Guia_prtico_final.pdf)
- CRUZ P. S., CARAMONA M., GUERREIRO M. P. - **Uma reflexão sobre a automedicação e medicamentos não sujeitos a receita médica em Portugal**. Rev. Port. Farmacot, 7 (2015) 83-90.
- MANKTELOW J., JACKSON K., SWIFT C., EDWARDS S., BISHOP L, PEARCEY E., MUGRIDGE T., BELL S., ROBISON R., ELEANOR B. - **SWOT Analysis: Discover New Opportunities, Manage and Eliminate Threats** [Acedido a 10 de maio de 2018]. Disponível na Internet: [https://www.mindtools.com/pages/article/newTMC\\_05.htm](https://www.mindtools.com/pages/article/newTMC_05.htm)

## 5. ANEXOS

### ANEXO I – CASOS PRÁTICOS

#### CASO I: INDICAÇÃO FARMACÊUTICA

Uma utente com cerca de 30 anos, deslocou-se à farmácia e requisitou a contraceção oral de emergência (COE), alegando ter tido relações sexuais desprotegidas na noite anterior.

Perante o seu requisito, fiz algumas perguntas para perceber qual a indicação que devia fazer. Sabendo que a relação sexual tinha ocorrido há menos de 5 dias, perguntei-lhe se já tinha tomado alguma vez a COE neste ciclo menstrual, pelo que me respondeu que nunca tinha tomado. Perguntei ainda se sofria de algum problema de saúde mais grave, à qual a utente respondeu negativamente, o que se verificou pelo seu histórico no *Sifarma 2000*<sup>®</sup>, visto que era uma cliente habitual da farmácia. Finalmente tentei perceber se tomava algum contraceptivo oral, ao que me respondeu que não, uma vez que costumava usar sempre preservativo.

Posto isto, e após recolher toda a informação necessária, recomendei a *Norlevo*<sup>®</sup> (pílula de toma única com 1,5 mg de levonorgestrel). Informei-a que deveria proceder à toma o mais rápido possível, que deveria usar um método contraceptivo de barreira até ao início da menstruação seguinte e que poderia experienciar alguns efeitos adversos, como *spotting*, ou alterações no ciclo menstrual, pelo que a menstruação poderia começar com alguns dias de atraso. Por fim, alertei que deveria repetir a toma em situação de vómito nas 3 horas seguintes à toma. (Costa *et al.*) Achei também importante referir a importância da utilização de um outro método contraceptivo, para evitar situações de esquecimento, como era o caso. Assim, aconselhei a utente a marcar uma consulta no ginecologista para ser devidamente avaliada, caso ponderasse iniciar um outro contraceptivo.

## CASO II: ACONSELHAMENTO EM DERMOFARMÁCIA E COSMÉTICA

Uma jovem de cerca de 16 anos, acompanhada pela sua mãe, dirigiu-se à farmácia à procura de um tratamento para a pele acneica.

Após avaliação da zona facial da utente, verifiquei que evidenciava algumas pústulas na zona da testa e várias manchas castanhas, derivadas de pústulas antigas. Fiz então algumas perguntas à utente, para identificar as suas necessidades, sendo que tentei perceber se procedia à limpeza e hidratação facial diária, se usava proteção solar e se era frequente usar maquilhagem. Fiquei a saber então que a utente fazia apenas hidratação diária com um creme para peles oleosas, sem fazer um reforço de proteção solar ou limpeza. A utente referenciou também que gostaria de começar a usar maquilhagem para disfarçar as marcas que tinha na testa.

Assim, aconselhei-lhe o produto de limpeza da gama *Acniben*<sup>®</sup> da *ISDIN*<sup>®</sup>, uma emulsão de limpeza facial suave, e o produto da gama de fotoproteção da *ISDIN*<sup>®</sup>, o *Gel Cream Dry Touch*<sup>®</sup> com cor. A minha maior preocupação foi, sem dúvida, garantir que a utente fizesse proteção solar facial 50+, uma vez que sem ela, as manchas castanhas poderiam agravar ainda mais. Para além de que íamos entrar na fase de verão, altura em que a fotoproteção facial deve ser diária, mesmo sem ser em dias de praia, e ainda para mais em peles com tendência acneica. A utente entendeu a importância desta questão e acabou por levar o produto, uma vez que também respondia à sua necessidade de disfarçar as imperfeições, pelo seu efeito matificante e unificante do tom da pele. Finalmente, expliquei-lhe também a importância da limpeza diária facial, de modo a remover as impurezas acumuladas nos poros ao longo do dia. A utente percebeu que a ausência deste hábito poderia proporcionar o desenvolvimento de mais pústulas, pelo que levou também o produto de limpeza.

## ANEXO II - PREPARAÇÃO INDIVIDUALIZADA DA MEDICAÇÃO

Imagem 1: Preparação Individualizada da Medicação Semanal, com 4 tomas diárias.



Imagem 2: Preparação Individualizada da Medicação Semanal, com esquema terapêutico. A imagem mostra a embalagem externa do sistema SPD Venalink e o blister correspondente. A embalagem externa contém o nome do sistema, o logotipo da Venalink e informações sobre a farmácia. O blister é dividido em 4 colunas (JEIUM, PEQ ALMOÇO, JANTAR, 30 min antes de DEITAR) e 7 linhas (DIA), totalizando 28 compartimentos. Cada compartimento contém as medicações prescritas para aquele dia e horário.

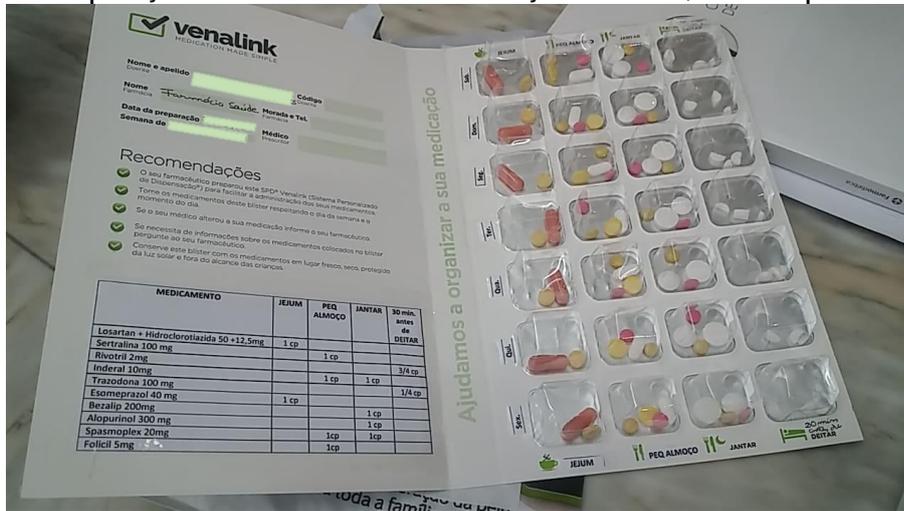
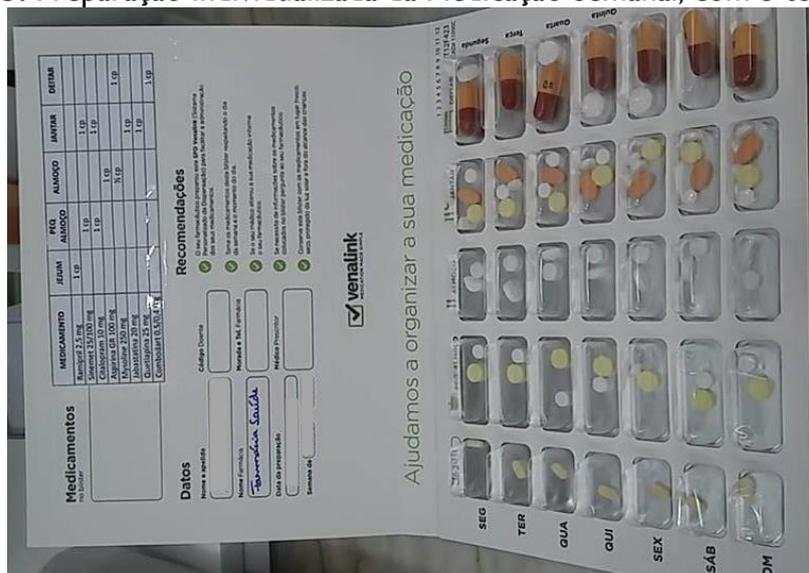


Imagem 3: Preparação Individualizada da Medicação Semanal, com 5 tomas diárias. A imagem mostra a embalagem externa do sistema SPD Venalink e o blister correspondente. A embalagem externa contém o nome do sistema, o logotipo da Venalink e informações sobre a farmácia. O blister é dividido em 5 colunas (JEIUM, PEQ ALMOÇO, JANTAR, 30 min antes de DEITAR, 30 min depois de DEITAR) e 7 linhas (DIA), totalizando 35 compartimentos. Cada compartimento contém as medicações prescritas para aquele dia e horário.



## **PARTE II**

### **IMUNOTERAPIA ATIVA PARA O CANCRO DA MAMA: POTENCIAIS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS**

Orientação pela Professora Doutora Alexandrina Ferreira Mendes

## RESUMO

O cancro é uma doença complexa e destrutiva com elevada taxa de incidência na população mundial. Por sua vez, o cancro da mama é uma doença heterogénea que engloba um complexo grupo de carcinomas, sendo o tipo de cancro que mais afeta as mulheres mundialmente. A classificação do cancro da mama é crucial para a determinação do tratamento a instituir, uma vez que as particularidades de cada subtipo requerem diferentes abordagens terapêuticas. Desta forma, o cancro da mama divide-se em 4 subtipos, de acordo com os parâmetros moleculares: Luminal A, Luminal B, sobreexpressão de HER2+ e cancro da mama triplo negativo (TNBC). Esta classificação é feita com base na presença/ausência de recetores hormonais de estrogénio e progesterona, e com base na expressão da proteína HER2.

O tratamento do cancro da mama tem evoluído ao longo dos últimos anos, sendo que o objetivo é, cada vez mais, investir nas terapias direcionadas, em detrimento das terapias convencionais de quimioterapia ou radioterapia, dado os seus efeitos adversos e impacto negativo na vida do doente. Assim, a imunoterapia surgiu como uma nova era de tratamento para o cancro da mama, podendo dividir-se em imunoterapia ativa ou passiva, com base na sua capacidade de (re)ativar o sistema imune do hospedeiro contra as células tumorais. Como tal, os anticorpos monoclonais são um exemplo claro de imunoterapia passiva, uma vez que possuem atividade antineoplásica própria, enquanto que os inibidores dos checkpoints imunes e as vacinas terapêuticas para o cancro são considerados formas ativas de imunoterapia, por direcionarem o sistema imune do indivíduo para a destruição do tumor.

O sucesso desta estratégia terapêutica colocou a imunoterapia na vanguarda do tratamento oncológico, sendo um tema muito em voga, que se encontra sob intensa investigação clínica, em particular no âmbito do cancro da mama. Aqui, destaca-se o potencial terapêutico das vacinas para o cancro, uma vez que a sua ação passa pela administração de antígenos tumorais ao doente, o que permite a amplificação da ação do sistema imunitário. Esta administração pode ser feita, essencialmente, através de vacinas à base de peptídeos ou de células dendríticas. Assim, a presente monografia está focada nos diferentes tipos de vacinas terapêuticas e na evidência da sua eficácia, apresentando e discutindo os resultados de estudos clínicos e pré-clínicos dos vários tipos de abordagem imunoterapêutica ativa.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cancro da mama, Tratamento, Imunoterapia Ativa, Vacinas Terapêuticas, Vacinas à base de peptídeos, Vacinas à base de células dendríticas.

## **ABSTRACT**

Cancer is a complex and destructive disease with high incidence rates in the world's population. Within this group, Breast Cancer stands out as a heterogeneous disease which includes a wide variety of carcinomas, being the type of cancer that most affects the women worldwide. The classification of breast cancer is crucial to determine the type of treatment to establish, since the different subtypes require different therapeutic approaches. Therefore, breast cancer can be divided into 4 subtypes, according to the molecular parameters: Luminal A, Luminal B, overexpression of the HER2 (HER2+) and triple negative breast cancer (TNBC). This classification is based on the expression or absence of the of the estrogen or progesterone hormonal receptors, as well as the eventual expression of the protein HER2.

The treatment of breast cancer has evolved drastically for the past few years, always aiming to invest, more and more, on targeted therapies, instead of the conventional treatment with chemotherapy or radiotherapy, given its adverse effects and negative impact on patients' lives. In that way, Immunotherapy arose as a new treatment era for breast cancer, which can be divided into passive or active immunotherapy, depending on the ability of (re)activate the patient's own immune system against the tumour cells. Moreover, the monoclonal antibodies are a clear example of passive immunotherapy, once they have intrinsic antineoplastic activity, whereas the immune checkpoint inhibitors and the therapeutic vaccines are considered as active forms of immunotherapy, given their ability to redirect the patient's immune system to the destruction of the tumour.

The success of this therapeutic strategy has placed immunotherapy in the forefront of oncologic treatment, being a very current issue that is under intense clinical investigation, particularly on the field of breast cancer. Here, the potential of the therapeutic vaccines stands out, given the fact that its action is based on the administration of tumour antigens to the patient, resulting in the amplification of the immune system's action. This administration can be done, essentially, through peptide vaccines or vaccines based on dendritic cells. Thus, the present monography is focused both on the different types of therapeutic vaccines and the evidence of its efficacy, through the presentation of several clinical and preclinical studies of the different approaches of active immunotherapy.

**KEYWORDS:** Breast Cancer, Immunotherapy, Active Immunotherapy, Therapeutic Vaccines, Peptide Vaccines, Vaccines based on Dendritic Cells.

## **ABREVIATURAS**

**ACT** - Transferência Celular Adotiva (*Adotive Cell Transfer*)

**APCs** - Células Apresentadoras de Antígenos (*Antigen Presenting Cells*)

**BRCA** - Genes de Suscetibilidade para o Cancro da Mama (*Breast Cancer Susceptibility Genes*)

**CAR** - Recetores de Antígenos Quiméricos (*Chimeric Antigen Receptor*)

**CEA** - Antígeno Carcino-embrionário (*Carcinoembryonic antigen*)

**CT** - *Cancer-Testis*

**CTL** - Linfócitos Citotóxicos T (*Cytotoxic T Lymphocytes*)

**CTLA-4** - Antígeno 4 dos Linfócitos T Citotóxicos (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*)

**DCs** - Células Dendríticas (*Dendritic Cells*)

**DCis** - Carcinoma Ductal *in situ* (*Ductal Carcinoma in situ*)

**EGF** - Fator de Crescimento Epidermal (*Epidermal Growth Factor Receptor*)

**EGFR** - Recetor do Fator de Crescimento Epidermal (*Epidermal Growth Factor Receptor*)

**ER** - Recetor de Estrogénio (*Estrogen Receptor*)

**FDA** - *Food and Drug Administration*

**HER2** - Recetor do Fator de Crescimento Epidermal Humano 2 (*Human Epidermal Grow Factor Receptor*)

**GM-CSF** - Fator Estimulante de Colónias de Macrófagos-Granulócitos (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

**HLA** - Antígeno Leucocitário Humano (*Human Leukocyte Antigen*)

**IL** - Interleucina (*Interleukin*)

**LAG-3** - Gene 3 de Ativação de Linfócitos (*Lymphocyte Activation Gene*)

**LCis** - Carcinoma Lobular *in situ* (*Lobular Carcinoma in situ*)

**MAGE-1** - (*Melanoma-Associated Antigen 1*)

**mAbs** - Anticorpos Monoclonais (*Monoclonal Antibodies*)

**MDSC** - Células Supressoras derivadas de Células Mielóides (*Myeloid-Derived Suppressor Cell*)

**MHC** - Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*)

**MUC-I** - Mucina-I (*Mucine-I*)

**mRNA** - Ácido Ribonucleico Mensageiro (*Messenger Ribonucleic Acid*)

**NK** - *Natural Killers*

**PD-I** - Recetor de Morte Celular Programada-I (*Programmed Death Receptor-I*)

**PD-LI** - Ligando-I do Recetor de Morte Celular Programada (*Programmed Death-ligand I*)

**PR** - Recetor de Progesterona (*Progesterone Receptor*)

**TA** - Antígenos tumorais (*Tumor Antigens*)

**TAA** - Antígenos Associados ao Tumor (*Tumor-associated Antigen*)

**TAM** - Macrófagos Associados ao Tumor (*Tumor-Associated Macrophage*)

**TCR** - Recetor das Células T (*T Cell Receptor*)

**TIL** - Linfócitos Infiltrantes de Tumor (*Tumor Infiltrating Lymphocytes*)

**TLRs** - Recetores Toll-Like (*Toll-Like Receptors*)

**TGF- $\beta$**  - Fator de Crescimento Transformante  $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* )

**TNBC** - Cancro da mama triplo-negativo (*Triple Negative Breast Cancer*)

**TSA** - Antígenos Específicos do Tumor (*Tumor Specific Antigens*)

## I. INTRODUÇÃO

O cancro é uma doença multifatorial, complexa e destrutiva, com elevada taxa de incidência e mortalidade na população mundial. (Mehrabi *et al.*, 2017) O cancro da mama, por sua vez, é o tipo de cancro que mais afeta as mulheres mundialmente, na Europa e em Portugal, apresentando, em 2012, taxas de incidência de 25,1%, 28,6% e 29,4%, respetivamente. (World Health Organization, 2012) Apesar da diminuição da taxa de mortalidade, graças à crescente monitorização da população, aos avanços nas técnicas de deteção precoce e ao aparecimento de novas terapias, o cancro da mama continua a ser a principal causa de morte por cancro, nas mulheres (Figura 1). Esta doença representa, sem dúvida, um dilema de saúde pública mundial. (Akram *et al.*, 2017; Monnot e Romero, 2017)

A crescente incidência global é o reflexo dos vários fatores de risco predisponentes ao desenvolvimento do cancro da mama, os quais incluem história familiar da doença, mutações nos genes supressores tumorais BRCA 1 e BRCA 2, maior exposição endógena a estrogénios (nuliparidade, menarca precoce, menopausa e gravidez tardia), excesso de ingestão de álcool, sedentarismo, excesso de peso (risco de cancro da mama pós-menopáusico), uso de hormonas exógenas (contracetivos orais e terapia hormonal de substituição), e, finalmente, a exposição excessiva a radiações no peito, principalmente em jovens. Muitos dos fatores de risco enumerados são modificáveis, sendo a causa de cerca de 20% dos casos de cancro da mama, a nível mundial. (Torre *et al.*, 2017) O aumento da taxa de incidência deve-se ainda à maior acessibilidade a técnicas de rastreio, como a mamografia, o que resulta num maior número de diagnósticos de tumores em estádios iniciais. No entanto, estes avanços na deteção precoce, bem como no tratamento e resseção cirúrgica de tumores, não se refletem num decréscimo significativo da mortalidade. (Monnot e Romero, 2017; Torre *et al.*, 2017)

Assim, é imperativo focar os esforços no desenvolvimento de novas terapêuticas para o cancro da mama. O tratamento mantém-se difícil e desafiante, apesar das melhorias observadas nas terapias convencionais. A cirurgia, quimioterapia e radioterapia, têm sido os principais métodos de tratamento ao longo das últimas décadas, dado o seu potencial terapêutico. No entanto, não são de todo ideais, uma vez que, para além dos diversos efeitos secundários que implicam, são ineficientes no controlo do cancro da mama metastizado e no tratamento de alguns dos subtipos agressivos. Por estes motivos, é urgente investir em novas terapias inovadoras. Os avanços em investigação revelaram novas alternativas para combater o cancro, através da utilização dos poderosos mecanismos de defesa do sistema imune, introduzindo uma nova realidade: a imunoterapia. (Mehrabi *et al.*, 2017; Monnot e Romero, 2017)

A presente monografia foi desenvolvida com o intuito de apresentar as potencialidades da imunoterapia ativa como terapêutica do cancro da mama. Após uma descrição detalhada da fisiopatologia e classificação do cancro da mama, bem como dos seus antigénios específicos, são apresentadas as diferentes estratégias de imunoterapia ativa existentes. O foco deste trabalho foi, essencialmente, nas vacinas terapêuticas para o cancro da mama, mais concretamente nas vacinas à base de peptídeos e de células dendríticas. Finalmente, foi feita uma recolha de evidência de diferentes estudos de eficácia clínicos e pré-clínicos, publicados recentemente, de forma a expor o panorama atual desta área de tratamento do cancro da mama. Estes resultados foram analisados de forma crítica e fundamentada, o que culminou numa reflexão sobre os desafios das vacinas terapêuticas e sobre a necessidade de apostar em regimes terapêuticos de combinação no futuro.

## **2. FISIOPATOLOGIA DO CANCRO DA MAMA**

A mama feminina é essencialmente constituída por tecido glandular - parênquima glandular mamário - que inclui os lóbulos e ductos mamários, e por estroma – tecido adiposo e conjuntivo - que preenche a área entre os diferentes lobos mamários, envolvendo ductos, lóbulos, vasos sanguíneos e vasos linfáticos. A estrutura da mama contém cerca de 12 a 20 lobos, que estão subdivididos em pequenos lóbulos, sendo que estes se encontram interligados através de uma rede de ductos mamários, como se pode observar na (Figura 2). (Akram *et al.*, 2017; American Cancer Society, 2018)

A unidade ducto-lobular terminal é constituída por diferentes tipos de células, com fenótipo variável. As células basais, ou mioepiteliais, cuja função é a ejeção de leite, não possuem recetores de estrogénio (*Estrogen Receptor - ER*), nem recetor de progesterona (*Progesterone Receptor - PR*). Já as células luminais, ou epiteliais, possuem recetores de estrogénios e podem possuir ou não recetores de progesterona, produzindo leite através de estimulação hormonal. (Wong e Rebelo, 2012)

O tecido tumoral é constituído pelas células cancerígenas e células estromais envolventes, que englobam células inflamatórias, imunocompetentes e endoteliais e os fibroblastos. (Tanaka *et al.*, 2017) Todas as lesões do cancro da mama surgem das unidades ducto-lobulares terminais, mas apresentam elevada variabilidade fenotípica. Assim, a realização de uma biópsia mamária, com vista a determinar o subtipo histológico e molecular do carcinoma, é determinante para o tratamento a implementar. (Wong e Rebelo, 2012)

Atualmente, sabe-se que o cancro é caracterizado por uma acumulação de alterações genéticas e pelo descontrolo dos processos normais de regulação celular. (Chen e Mellman,

2013) De acordo com estudos recentes, considera-se que as principais causas para o desenvolvimento de um fenótipo cancerígeno invasivo e resistente à terapia farmacológica sejam a sobreexpressão de recetores e fatores de crescimento, a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumores. Determinadas disfunções nas vias de sinalização intracelulares estão também implicadas no desenvolvimento e progressão do cancro. (Mehrabi *et al.*, 2017)

### **3. CLASSIFICAÇÃO DO CANCRO DA MAMA**

O cancro da mama é uma doença heterogénea que engloba um complexo grupo de carcinomas e cujas características variam consideravelmente entre doentes – heterogeneidade intertumoral – e, inclusive, dentro do próprio indivíduo – heterogeneidade intratumoral. Esta terminologia engloba, assim, diferentes subtipos de cancro da mama, que podem ser classificados histologicamente ou molecularmente. (Turashvili e Brogi, 2017)

#### **3.1. CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA**

A heterogeneidade intertumoral morfológica e clínica do cancro da mama é refletida na classificação histopatológica e nos diferentes estadios da doença. (Turashvili e Brogi, 2017) Dependendo da localização do tumor mamário, podemos classificá-lo como carcinoma *in situ* ou carcinoma invasivo, o que corresponde a cerca de 25% e 75% dos casos, respetivamente. No carcinoma *in situ*, o cancro não ultrapassa a membrana basal, isto é, está limitado aos ductos ou lóbulos onde teve origem, sendo classificado como Carcinoma Lobular *in situ* (*Lobular Carcinoma in situ* - LCis) ou Carcinoma Ductal *in situ* (*Ductal Carcinoma in situ* - DCis), respetivamente. Por outro lado, no carcinoma invasivo, o cancro transpõe a membrana, afetando o tecido circundante dos lóbulos ou ductos de origem, podendo invadir os gânglios linfáticos envolventes ou até metastizar. Dentro dos diferentes tipos de cancro da mama invasivo, o carcinoma ductal invasivo constitui cerca de 80% dos casos, o carcinoma lobular invasivo 10 a 15% e, os restantes casos, dizem respeito a formas mais raras, tais como o Carcinoma Inflamatório da mama ou os tumores mistos. (McClure *et al.*, 2011)

#### **3.2. CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR**

As classificações moleculares do cancro da mama são evidência da heterogeneidade genética dos tumores, que se traduz na expressão de diferentes proteínas que constituem biomarcadores preditivos em que se incluem recetores hormonais e da oncoproteína fator de crescimento epidermal humano 2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor* - HER2), também os alvos das terapias direcionadas. (Turashvili e Brogi, 2017) A classificação atual do cancro da mama é, portanto, feita de acordo com a presença/ausência de recetores hormonais de

estrogénio e progesterona e com base na expressão da proteína HER2. (Costa, Soliman e Czerniecki, 2017)

Por conseguinte, o cancro da mama pode dividir-se em 4 subtipos, de acordo com os parâmetros moleculares referidos: Luminal A e Luminal B, sobreexpressão de HER2 (HER2+) e triplo negativo (*Triple Negative Breast Cancer -TNBC*). (Monnot e Romero, 2017)

Os tumores do tipo **Luminal A** (40% dos casos) têm origem nas células do lúmen dos ductos das glândulas mamárias, caracterizando-se pela presença de ambos os recetores hormonais, PR e ER, e ausência de HER2. No geral, são o subtipo que apresenta melhor prognóstico e, dado o seu fenótipo ER+/PR+/HER2-, são sensíveis ao tratamento hormonal, respondendo bem à terapia com tamoxifeno (agonista parcial dos recetores de estrogénio) e com inibidores seletivos da aromatase, como o anastrozol. Por estas razões, na maioria dos casos, o tratamento é apenas este. (Monnot e Romero, 2017; Yu *et al.*, 2017) Em caso de progressão ou recidiva, a terapêutica com fulvestrant, um dos antagonistas dos ER, é atualmente a única alternativa não biológica.

O subtipo **Luminal B** (20% dos casos) deriva igualmente das células epiteliais luminais, mas é menos agressivo e não responde tão bem ao tratamento com tamoxifeno, pelo que requer terapia citotóxica adicional. Caracteriza-se pela presença de ER e ausência dos PR, podendo ou não expressar o HER2. Desta forma, pode apresentar um fenótipo Luminal B HER2- (ER+, PR- e HER2-) ou Luminal B HER2+ (ER+, PR- e HER2+), sendo que ambos estão associados a uma elevada taxa de proliferação tumoral. O primeiro é tipicamente tratado com terapia antiestrogénica e quimioterapia, enquanto que o segundo necessita de tratamento direcionado anti-HER2, para além da terapia antiestrogénica e quimioterapia. (Monnot e Romero, 2017; Yu *et al.*, 2017)

Os carcinomas **HER2+**, em que existe sobreexpressão da proteína HER2 (10 a 15% dos casos), não possuem recetores hormonais, o que corresponde ao um perfil fenotípico ER, PR- e HER2+. Em geral, apresentam um mau prognóstico e uma rápida progressão, pelo que o tratamento recomendado é a associação de quimioterapia e imunoterapia, com trastuzumab, um anticorpo monoclonal anti-HER2. A utilização de imunoterapia nos tumores que expressam o HER2, permite um aumento de cerca de 30% da taxa de sobrevivência, comparando com o uso somente de quimioterapia. (Monnot e Romero, 2017; Yu *et al.*, 2017)

Por fim, o cancro da mama triplo-negativo (**TNBC**) tem características biológicas únicas, dada a sua elevada heterogeneidade e o facto de não expressar nenhum dos marcadores acima mencionados, pelo que não é possível estabelecer um tratamento padrão.

A expressão negativa de todos os alvos moleculares (ER-, PR-, HER2-) torna-o ineligível para o tratamento com terapias direcionadas, sendo a quimioterapia a opção mais viável e, muitas vezes, a única. (Monnot e Romero, 2017; Yu *et al.*, 2017) Atualmente, estes doentes são submetidos a terapias combinadas envolvendo cirurgia, quimioterapia e radioterapia, o que faz com que seja o subtipo de cancro da mama com pior prognóstico e taxas de sobrevivência mais baixas. (Ling *et al.*, 2017).

O grupo dos TNBC (15 a 20% dos casos) é, como foi referido, altamente heterogêneo, podendo ainda ser subdividido em diferentes tipos de tumores. O subtipo com maior atividade imune é, entre todos, o que apresenta melhor prognóstico. Esta evidência apoia a hipótese de que uma boa infiltração do sistema imune no tumor e no seu microambiente, ajuda a combater a progressão tumoral, fenómeno designado por imunoedição. (Monnot e Romero, 2017)

#### **4. IMUNOEDIÇÃO E IMUNOVIGILÂNCIA: MICROAMBIENTE TUMORAL**

Atualmente, está bem estabelecido que o sistema imune desempenha um papel crucial na monitorização do desenvolvimento do cancro, falando-se do fenómeno de imunoedição (*cancer immunoediting*).

É um processo dinâmico constituído por 3 fases: eliminação, equilíbrio e fuga imune. A eliminação, baseia-se no conceito de imunovigilância (*cancer immunosurveillance*), função exercida pelo sistema imune inato e adaptativo, cujo objetivo é a destruição tumoral. O equilíbrio imunológico é um período de latência imuno-mediada, estabelecido após destruição incompleta do tumor na primeira fase, em que não ocorre progressão nem regressão tumoral. Por fim, a fase de escape imune refere-se à capacidade das células tumorais de superar o controlo imunitário, uma vez que adquirem características que as tornam indetetáveis às células imunitárias. (Chodon, Koya e Odunsi, 2015)

Desta forma, é evidente que o sistema imunitário, para além de proteger o organismo contra o desenvolvimento de cancro, também molda e influencia a sua imunogenicidade, podendo tanto suprimir o crescimento tumoral, como promover a sua progressão. (Li, L., Goedegebuure e Gillanders, 2017)

Assim, para que ocorra desenvolvimento tumoral, os cancros têm de escapar à resposta imune e criar um ambiente inflamatório promotor do tumor, através da atração de células imunes pró-tumorais, formando-se assim o microambiente tumoral. (Monnot e Romero, 2017)

O microambiente tumoral é, portanto, caracterizado pelo conjunto das células cancerígenas, das células pró-tumorais de infiltração e dos correspondentes fatores solúveis, constituindo um bom indicador de prognóstico. O entendimento da sua composição e funcionamento, bem como da noção de como intervir no mesmo, é crítico para a melhoria das estratégias de imunoterapia já existentes. (Monnot e Romero, 2017; Yu *et al.*, 2017)

Determinar os mecanismos de evasão da células do cancro da mama é crucial para o desenvolvimento de tratamento mais eficazes, sendo esta capacidade de evasão à destruição imune devida à presença dos seguintes fatores no microambiente tumoral: (i) recetores co-estimulatórios de inibidores do sistema imune, tais como PD-1, CTLA-4, LAG-3; (ii) fatores imunossupressores derivados do tumor, tais como TGF- $\beta$ , IL-10, IDO; e, por fim, (iii) a infiltração de células imunossupressoras, tais como linfócitos T reguladores, células supressoras derivadas de células mieloides (Myeloid-Derived Suppressor Cel - MDSC) e macrófagos associados ao tumor (TAM). Estas células têm, assim, a capacidade de aumentar a sua tolerância (*self-tolerance*) à resposta imune, escapando e alterando as funções das células NK (*Natural Killers*). Todos estes fatores contribuem para a fraca imunogenicidade do cancro da mama. (Bates *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2017)

Assim, o desafio atual é utilizar o entendimento do papel do sistema imune no tratamento do cancro da mama para desenvolver novas terapias e implementar novas estratégias terapêuticas, tais como a imunoterapia. (Chen e Mellman, 2013; Monnot e Romero, 2017)

## 5. IMUNOTERAPIA

O crescente entendimento da interação dinâmica entre o sistema imune e o cancro inspirou a criação de novas abordagens de tratamento, aproveitando o potencial do sistema imune. Ao contrário dos métodos de tratamento clássicos, em que a imunoestimulação surge como um efeito secundário, as imunoterapias são concebidas especificamente para redirecionar o sistema imune para a destruição de tumores. (Monnot e Romero, 2017) Assim, o propósito da imunoterapia é tirar proveito da ação do sistema imune para a destruição seletiva dos tumores, deixando os tecidos normais saudáveis intactos. (Li, L. *et al.*, 2017)

Os requisitos para o alcance de uma resposta imune robusta e de uma melhor destruição e rejeição imunológica do tumor (Arab *et al.*, 2017) incluem a geração de um número suficiente de células T efetoras com alta avidéz para o reconhecimento de antigénios tumorais *in vivo*, uma boa infiltração e *trafficking* no tumor de células dendríticas e linfócitos T CD4+ e CD8+, a superação da imunossupressão presente no microambiente tumoral e a

persistência dos linfócitos T antitumorais no mesmo.(Banchereau e Jacques, 2013; Chodon et al., 2015)

As estratégias mais promissoras incluem (i) a transferência passiva de imunidade antitumoral, (ii) o uso de agentes imunomoduladores que atuem na imunidade endógena, naturalmente adquirida, (iii) a inibição da imunossupressão gerada no microambiente tumoral, e (iv) a indução ativa de uma reposta imune robusta, através da vacinação terapêutica. (Li, L. et al., 2017; Monnot e Romero, 2017)

Assim, a imunoterapia pode ser subdividida em “passiva” e “ativa” com base na sua capacidade de usar o sistema imune do hospedeiro contra o cancro, isto é, de o (re)ativar contra as células cancerígenas, induzindo ou intensificando a sua resposta. Com base nestes critérios, podemos classificar os anticorpos monoclonais (*Monoclonal Antibodies* mAbs) direcionados para o tumor e a transferência adotiva de células (ACT), entre outras, como formas passivas de imunoterapia, uma vez que têm atividade intrínseca antineoplásica própria. Por outro lado, as vacinas para o cancro e os inibidores dos *checkpoints* imunes exercem os efeitos antitumorais através da utilização do próprio sistema imune do doente, representando exemplos claros de imunoterapia ativa. (Galluzzi et al., 2014)

No entanto, esta classificação está, atualmente, um pouco desatualizada, não refletindo a complexidade das interações entre o composto terapêutico, sistema imune e tumor (Galluzzi et al., 2014), uma vez que existem múltiplos mecanismos de ação associados ao mesmo composto, pelo que este pode ser incluído em ambas as estratégias.

O sucesso destes tratamentos inovadores, nos últimos anos, colocou a imunoterapia na vanguarda do tratamento oncológico (Li, L. et al., 2017), sendo que, atualmente, é um campo que se encontra em rápida expansão e sob intensa investigação clínica. (Dillon et al., 2017)

## **5.1. IMUNOTERAPIA PASSIVA NO CANCRO DA MAMA**

A impressionante heterogeneidade genética intra e intertumoral do cancro da mama representa um dos maiores desafios no desenvolvimento de novas terapias. Perante este cenário, a imunoterapia surgiu como uma alternativa promissora, baseada na premissa de que a ativação passiva da imunidade celular adaptativa, conduz a uma atividade antitumoral e melhoria clínica. (Bryson et al., 2017; Costa et al., 2017)

A imunoterapia passiva define-se, assim, como a transferência de elementos imunes, que irão exercer uma ação direta no tumor do doente. Assim, o tratamento passivo consiste essencialmente, na infusão de anticorpos monoclonais direcionados para antígenos associados

ao tumor (*Tumor-associated Antigen - TAA*) e na transferência celular adotiva (*Adotive Cell Transfer - ACT*). (Costa et al., 2017)

Dentro do primeiro grupo, destaca-se o trastuzumab, um anticorpo monoclonal direcionado para a proteína HER2, recetor este que tem sido um alvo de eleição no combate ao cancro da mama, uma vez que está sobreexpresso em cerca de 30% dos casos. Em 1998, o trastuzumab foi aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) como terapia para o cancro da mama avançado. Desde então, os estudos demonstram que o tratamento com este anticorpo diminuiu a taxa de mortalidade em 50%, em pacientes com cancro da mama HER2+, e que equiparou a taxa de sobrevivência a 5 anos à dos pacientes com cancro da mama HER2- . Posteriormente, foi ainda evidenciado que, em combinação com agente quimioterápicos, tais como a doxorrubicina e a ciclofosfamida, permite aumentar a taxa de sobrevivência a 1 ano de 67% para 78%. (Bryson et al., 2017; Monnot e Romero, 2017)

Por outro lado, na transferência celular adotiva (ACT) é feita a administração, não de anticorpos, mas de linfócitos T citotóxicos, com capacidade de reconhecer e destruir células cancerígenas. Estes podem ser linfócitos infiltrantes do tumor (*Tumor Infiltrationg Lymphocytes - TILs*) autólogos, linfócitos geneticamente modificados, por transdução, expressando recetores de células T (*T Cell Receptor - TCR*) ou recetores de antígenos quiméricos (*Chimeric Antigen Receptor - CAR*). (Costa et al., 2017; Souza et al., 2015)

No entanto esta técnica, apesar de promissora noutros cancros, como melanomas ou neoplasias hematológicas, é pouco utilizada no cancro da mama devido, principalmente, a dificuldades na cultura *ex vivo* de TILs e a questões quanto à segurança das células T com CAR específicos para HER2. (Monnot e Romero, 2017) Assim, estas estratégias permanecem ainda no seu estado inicial de desenvolvimento clínico para o tratamento do cancro da mama em geral. (Costa et al., 2017)

## **5.2. NECESSIDADE DE NOVAS TERAPÊUTICAS**

O cancro é, sem dúvida, uma doença altamente adaptativa e, portanto, os tratamentos têm de acompanhar estas estratégias de evolução e evasão, sendo quase imperativo a associação de diferentes terapias. A imunoterapia para o cancro tem demonstrado ser menos tóxica, em comparação com a quimioterapia e outros tratamentos tradicionais, o que se reflete num efeito diminuído na qualidade de vida dos doentes, comparando com as terapias convencionais. (Ling et al., 2017)

Um dos obstáculos mais significativos desta estratégia é a imunossupressão intrínseca e adquirida, observada nos doentes com cancro. (Yuan et al., 2017) O facto de ser uma doença

de origem oncológica, implica a superação de todos os obstáculos associados ao cancro em si: a imunossupressão gerada no microambiente tumoral, os mecanismos de evasão e resistência aos tratamentos direcionados, a capacidade de propagação e metastização, entre outros.

Em várias situações de cancro da mama metastático, a doença acaba por adquirir resistência às terapias direcionadas e, mesmo após remoção cirúrgica de tumores menos desenvolvidos, existe um risco elevado de recidiva, apesar do tratamento multimodal. (Costa *et al.*, 2017) Além disto, o risco de recorrência dos subtipos que expressam recetores hormonais ER e PR continua indefinido, o que resulta muitas vezes na administração de terapias adjuvantes a longo prazo, às quais estão associados múltiplos efeitos secundários. (Suh *et al.*, 2017) Já no caso do TNBC, devido à ausência de ER, PR, e HER2, que constituem os alvos para a maioria das terapias do cancro da mama, a quimioterapia, associada a uma toxicidade sistémica significativa, permanece uma das únicas opções de tratamento. Assim, é urgente investir em terapias direcionadas menos tóxicas e mais eficazes. (Yuan *et al.*, 2017)

A nova geração de sequenciação permitiu um novo entendimento sobre as alterações genómicas que ocorrem no cancro da mama durante o processo de progressão tumoral, permitindo a projeção de novos fármacos e terapias direcionadas que atuem nos mecanismos de resistência e nos antigénios específicos de cada subtipo tumoral. (Costa *et al.*, 2017)

### **5.3. IMUNOTERAPIA ATIVA NO CANCRO DA MAMA**

Apesar da descoberta de várias técnicas promissoras de imunoterapia passiva, onde se destacam os anticorpos monoclonais, a necessidade de novas terapêuticas permanece. É necessário dar respostas às situações de recidiva e aos estadios mais avançados da doença, com vista a atingir uma remissão permanente da doença ou impedir a sua progressão.

Desta forma, foram desenvolvidas várias abordagens inovadoras, no sentido de estimular o próprio sistema imune do doente a desenvolver uma resposta imunológica direcionada para o tumor. (Bryson *et al.*, 2017) Assistiu-se assim, na última década, a um progresso significativo no desenvolvimento deste tipo de terapias, cuja base está na iniciação *a de novo* ou potenciação da resposta imune do próprio organismo, contra as células cancerígenas. (Chodon *et al.*, 2015)

O propósito desta estratégia é melhorar a rejeição imunológica do tumor, através do sistema imune do próprio indivíduo. (Arab *et al.*, 2017) A imunoterapia ativa, ao contrário do que acontece na passiva, tem a capacidade de gerar atividade antitumoral para além do sistema imune adaptativo, uma vez que também estimula e interage com a componente inata do

mesmo. (Bryson *et al.*, 2017) Desta forma, esta pode ser dirigida ao tumor – vacinas terapêuticas ou ao microambiente tumoral – inibidores dos *checkpoints* imunes.

### **5.3.1. IMUNOTERAPIA ATIVA DIRIGIDA AO MICROAMBIENTE TUMORAL**

#### **5.3.1.1. INIBIDORES DOS CHECKPOINTS IMUNES**

As alterações genéticas que ocorrem ao longo do processo de carcinogénese dão origem a uma vasta variedade de alvos imunogénicos que podem ser reconhecidos pelo sistema imune. Contudo, as funções do sistema imunitário adaptativo são constantemente inibidas por vias de sinalização que se encontram desreguladas nos tumores. (Yu *et al.*, 2017) Estes têm a capacidade de escapar à resposta imunológica através da sobreexpressão de ligandos imunossupressores na sua superfície, de forma a interferir com a função dos *checkpoints* imunes. (Monnot e Romero, 2017)

Os *checkpoints* imunes são moléculas presentes na superfície celular dos linfócitos e células NK cujas funções fisiológicas são cruciais na modulação da resposta imune, prevenção da autoimunidade e manutenção da tolerância-própria. (Yu *et al.*, 2017) Funcionam como pontos críticos de controlo da resposta imunológica, sendo essenciais para a homeostasia do organismo. Estes tanto promovem a maximização do efeito protetor do sistema imune, como a minimização dos efeitos colaterais nos tecidos saudáveis envolventes, em situações de inflamação, infeções microbianas e de crescimento tumoral. (Monnot e Romero, 2017)

São vários os tipos de tumores sólidos que têm a capacidade de interferir com este mecanismo imunomodulador através da sobreexpressão dos ligandos dos *checkpoints* imunes na sua superfície, suprimindo assim a resposta imunológica a eles dirigida. O entendimento do papel desempenhado pelos *checkpoints* imunes na progressão tumoral permitiu o desenvolvimento de um novo conceito de imunoterapia ativa, baseado no bloqueio/inibição dos seus *ligandos* ou *receptores*, através da utilização de anticorpos monoclonais. (Monnot e Romero, 2017; Yuan *et al.*, 2017),

Um dos principais exemplos é o recetor de morte celular programada-1 (*Programmed Death Receptor-1*, PD-1), um recetor inibitório expresso na superfície dos linfócitos T ativados que, após interação com os seus ligandos PD-L1 e PD-L2, emite um sinal de controlo negativo que limita a atividade dos linfócitos T. Esta atividade antitumoral pode ser restabelecida pelo bloqueio da interação PD-1/PD-L1, através de anticorpos direcionados contra estas moléculas: os inibidores dos *checkpoints* imunes. (Yuan *et al.*, 2017)

Os inibidores dos checkpoints imunes mais usados em ensaios clínicos são o nivolumab e o pembrolizumab, cujo alvo é o PD-1, e o ipilimumab, cujo alvo é o antígeno 4 dos linfócitos T citotóxicos (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*, CTLA-4), sendo que o gene 3 de ativação de linfócitos (*Lymphocyte Activation Gene 3* - LAG3) é outro dos principais alvos desta terapia. A função destes anticorpos monoclonais (mAbs) imunomoduladores é inibir a interação entre os checkpoints imunes e os seus ligandos, com vista a desencadear ou restabelecer uma resposta antitumoral já existente. (Galluzzi *et al.*, 2014; Monnot e Romero, 2017)

Esta abordagem demonstrou grande potencial no tratamento de vários câncros sólidos, tais como melanoma, cancro da bexiga, cancro da mama, entre outros. Na área do cancro da mama, já foram lançados mais de 30 ensaios clínicos para testar a segurança e eficácia de inibidores dos checkpoints imunes. (Monnot e Romero, 2017)

### **5.3.1.2. CITOCINAS IMUNOMODULADORAS**

As citocinas são utilizadas como terapêutica imunomoduladora, devido às funções biológicas de regulação que desempenham no organismo. São uma terapêutica não específica do tumor, atuando na modulação das vias de sinalização do microambiente tumoral, com o intuito de revigorar ou estimular uma resposta imunológica pré-existente. Assim, a sua atividade antineoplásica depende do próprio sistema imunitário do doente, o que as inclui no paradigma de imunoterapia ativa. (Galluzzi *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2015)

Contudo, estas citocinas em monoterapia apresentam pouca, ou até nenhuma, atividade clínica. Por esta razão, são normalmente administradas num contexto de associação. Entre elas, destaca-se o fator estimulante de colónias de macrófagos-granulócitos (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* - GM-CSF) que tem a capacidade de potenciar a atividade clínica de diversas imunoterapias, incluindo vacinas peptídicas para cancro e inibidores dos checkpoints imunes. (Galluzzi *et al.*, 2014)

### **5.3.2. IMUNOTERAPIA ATIVA DIRIGIDA AO TUMOR: VACINAS TERAPÊUTICAS**

Ao contrário das vacinas profiláticas que induzem proteção contra o aparecimento da doença, as vacinas terapêuticas são projetadas para mediar a regressão da doença, após diagnóstico, ou mesmo atingir remissão completa. (Monnot e Romero, 2017) Uma vacina bem-sucedida deverá ter a capacidade de estimular o sistema imunitário e de o direcionar para um alvo tumoral viável que desempenhe um papel-chave no processo de progressão tumoral e/ou formação de metástases. (Yu *et al.*, 2017)

As vacinas para o cancro têm como finalidade tratar um tumor pré-existente, estimulando e potenciando o sistema imunitário do próprio doente, pelo que constituem uma estratégia aliciante para o tratamento do cancro da mama. A base na estratégia das vacinas para o cancro é, portanto, diferente da das vacinas profiláticas usadas no tratamento de doenças infecciosas, que estimulam os linfócitos B. Aqui, o objetivo não é apenas estimular a resposta imune humoral, mas também a celular, mediada pelos linfócitos T. (Li, X. e Bu, 2017)

Desta forma, as vacinas terapêuticas são projetadas no sentido de promover uma resposta imunológica mediada por células T, com vista à erradicação dos tumores. A sua ação passa por ativar especificamente (i) linfócitos T, incluindo tanto linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (*Cytotoxic T Lymphocytes* - CTL) como linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares, orientando-os para o reconhecimento e combate do cancro, e (ii) linfócitos B, de forma a desencadear uma resposta imune humoral com anticorpos, e ativar as células apresentadoras de antígenos (*Antigen Presenting Cells* - APCs), conseguindo desta forma induzir, simultaneamente, imunidade antitumoral celular e humoral. (Li, X. e Bu, 2017)

A resposta imune mediada por células T pode ser desencadeada diretamente através de vacinas à base de peptídeos, vacinas à base de células dendríticas, que estão “carregadas” com antígenos associados ao tumor (TAA) ou antígenos específicos do tumor (*Tumor Specific Antigens* - TSA), ou por células tumorais totais, modificadas geneticamente para segregarem GM-CSF ou outras citocinas. (Li, X. e Bu, 2017)

Assim, a imunoterapia ativa, através do uso de vacinas, representa uma estratégia autossustentada de ativação do sistema imunitário que estimula o sistema imune inato, pelo que a atividade antitumoral não fica limitada ao ramo adaptativo. Esta técnica abrange assim componente celular e humoral do sistema imune e pode ainda promover a disseminação de epítomos tumorais, desencadeando assim uma resposta imune contra outros antígenos associados ao tumor. (Costa *et al.*, 2017)

Concluindo, as vantagens desta técnica inovadora de imunoterapia para o cancro incluem (i) a alta especificidade para o antígeno tumoral, induzindo uma resposta imune robusta contra os antígenos associados ou específicos do tumor, (ii) a ocorrência de poucos efeitos adversos relacionados com a administração de vacinas, e (iii) a obtenção de imunidade duradoura, reforçada pela vacina, uma vez que esta induz uma resposta imunológica de memória, que é essencial para controlar uma possível recidiva. (Li, X. e Bu, 2017)

### **5.3.2.1. SELEÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE ANTIGÉNIOS TUMORAIS**

Os antígenos tumorais podem ser divididos, de um modo geral, em duas categorias: (i) antígenos específicos do tumor (TSA), que são expressos exclusivamente nas células cancerígenas e tecidos tumorais, tais como antígenos *cancer-testis* ou neoantígenos, e (ii) antígenos associados ao tumor (TAA), que se encontram sobreexpressos nos tumores mas estão simultaneamente presentes nos tecidos normais saudáveis, tais como os antígenos sobreexpressos e de diferenciação. Estes desencadeiam uma resposta celular e/ou humoral em doentes com cancro, originando antígenos ou epítomos que são posteriormente apresentados nas células tumorais, através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I, ou reconhecidos e processados pelas APCs e apresentados através do MHC classe II, estimulando as células T CD8+ e CD4+, respetivamente. (Chodon *et al.*, 2015; Li, X. e Bu, 2017)

A escolha do antígeno-alvo é um elemento crítico no desenvolvimento de uma vacina para o cancro, uma vez que este deve desempenhar um papel importante na progressão tumoral, apresentar uma expressão limitada, ou ausência nos tecidos normais e saudáveis e uma expressão anormal/aberrante no tumor. Assim, o antígeno escolhido deve reunir os seguintes requisitos: (i) presença no tumor, (ii) ausência nos tecidos saudáveis, (iii) imunogenicidade, (iv) potencial oncogénico, (v) evidência de eficácia terapêutica, (vi) posse de epítomos conhecidos e, por fim, (vii) a existência de modelos viáveis para o estudo dos efeitos específicos da vacina. (Bryson *et al.*, 2017; Chodon *et al.*, 2015)

### **5.3.2.2. ANTIGÉNIOS CANCER-TESTIS**

Os antígenos *cancer-testis* (CT), também conhecidos como antígenos da linha germinativa cancerígena, são proteínas expressas de forma anormal numa vasta variedade de cancros humanos e que estão ausentes nos tecidos normais saudáveis, à exceção das células germinativas. Este grupo de antígenos é reconhecido pelo sistema imune e tem a capacidade de originar tanto uma resposta celular como humoral, o que evidencia as suas características imunogénicas. (Li, X. e Bu, 2017) Assim, estes antígenos reúnem vários requisitos que os tornam um alvo terapêutico de eleição no tratamento com vacinas.

Ao longo dos anos têm sido identificados vários antígenos deste grupo em tumores mamários, dos quais se destacam dentro do cancro da mama o NY-ESO-1, MAGE, BAGE. De acordo com vários estudos, são encontrados em maior expressão no TNBC, destacando-se o NY-ESO-1, em comparação com os subtipos sensíveis a estrogénios. Estas descobertas podem constituir uma estratégia promissora para o tratamento deste subtipo do cancro da mama, geralmente associado a um pior prognóstico. (Li, X. e Bu, 2017)

### 5.3.2.3. ANTIGÉNIOS ASSOCIADOS AO CANCRO DA MAMA

A identificação de antígenos sobreexpressos no cancro da mama e a caracterização dos seus epítomos peptídicos pode aprofundar o conhecimento tanto no âmbito da imunoterapia passiva como da ativa. A maioria são antígenos associados ao tumor, tais como o HER2, MUC-1, p-53, Lalba, mamoglobina-A e CEA. (Chodon *et al.*, 2015; Li, X. e Bu, 2017)

#### **Antígeno HER2**

O papel das vias de sinalização ativadas por fatores de crescimento na patogénese do cancro da mama humano está, atualmente, bem estabelecido, sendo que diferentes famílias foram identificadas como parte integrante do processo de crescimento tumoral. Dentro destes, os recetores do fator de crescimento epidermal (*Epidermal Growth Factor Receptor - EGFR*) tem um papel central na patogénese e progressão de diferentes tipos de carcinomas. Existem 4 tipos, entre os quais se destaca o HER2, um recetor transmembranar com atividade cinase de tirosina. (Mehrabi *et al.*, 2017)

O HER2 encontra-se sobreexpresso em cerca de 30% dos casos de cancros, bem como em vários tipos de tumores epiteliais, incluindo no cancro do estômago, colorretal, ovárico e pancreático. (Li, X. e Bu, 2017; Monnot e Romero, 2017)

Este antígeno é altamente imunogénico, uma vez que foi detetada imunidade celular e humoral espontânea em doentes com tumores mamários HER2+, tornando-o num poderoso recurso a utilizar na vacinação ativa no cancro da mama. (Li, X. e Bu, 2017)

#### **Antígeno MUC1**

A mucina I (MUC1), é uma glicoproteína presente na membrana das células, que se encontra em sobreexpressão em vários tipos de carcinomas, como por exemplo, nos cancros da mama, pâncreas, pulmão e do trato gastrointestinal. Assume um papel importante na imunomodulação e em diferentes processos biológicos, uma vez que promove a adesão celular, o bloqueio de vias de sinalização apoptóticas e a regulação de vias de sinalização intracelulares envolvidas na regulação da proliferação celular. Assim, a sua presença é crucial para o desenvolvimento tumoral visto que integra as etapas de proliferação e diferenciação celular, apoptose e metastização. (Li, X. e Bu, 2017; Yu *et al.*, 2017)

A função biológica da mucina I é definida pela sua modificação pós-tradução, sendo que nas células epiteliais normais, a MUC1 está hiperglicosilada, enquanto que nas cancerígenas se encontra hipoglicosilada, por perda de polaridade luminal, resultando daí a sua alta imunogenicidade. (Li, X. e Bu, 2017)

Mais de 70% dos tumores mamários expressam este antigénio, pelo que constitui um biomarcador útil na monitorização da progressão do cancro e resposta à terapêutica. É também um antigénio de eleição para a vacinação, não só pela sua elevada expressão, mas também pelas características únicas do seu epítipo. Dada a sua estrutura altamente repetitiva e multivalente, este epítipo constitui um alvo eficaz para os linfócitos T citotóxicos, uma vez que tem a capacidade de estimular os recetores linfocitários, sem necessitar de apresentação pelo MHC. (Li, X. e Bu, 2017; Yu *et al.*, 2017)

### **NEOANTIGÉNIOS**

Ao contrário dos antigénios referidos anteriormente que integram o grupo dos TAA, os neoantigénios são específicos do tumor, uma vez que resultam de mutações somáticas que ocorrem no DNA das células tumorais. (Li, L. *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2017) O aumento do número de neoantigénios imunogénicos está, assim, associado a uma elevada carga mutacional, intimamente ligada a uma maior imunogenicidade do tumor e, consequentemente, a uma maior taxa de infiltração de linfócitos, tais como os T CD8+, dada a sua alta afinidade de ligação ao MHC I. (Li, L. *et al.*, 2017; Li, X. e Bu, 2017)

Por estas razões, têm vindo a ser estudados como alvos para vacinas personalizadas para o cancro. Esta é uma nova técnica viável de imunização humana, capaz de potenciar a imunidade dos linfócitos citotóxicos T contra os neoantigénios presentes no tumor de cada doente. (Li, X. e Bu, 2017) Estas vacinas são uma alternativa entusiasmante, dadas as potenciais vantagens de terem como alvo sequências que não estão presentes nos tecidos normais do organismo, para além do facto de terem uma tolerância ao sistema imune diminuída e um perfil de segurança melhorado. (Li, L. *et al.*, 2017)

## **5.4. VACINAS TERAPÊUTICAS PARA O CANCRO DA MAMA**

Apesar de este ser um tema muito em voga atualmente, a história das vacinas para o cancro iniciou-se em 1890, ano em que foi desenvolvida a primeira vacina para o cancro, por Coley. Historicamente, a vacinação marca o início da Imunoterapia como nova realidade de tratamento do cancro da mama, apesar de ter sido uma área pouco explorada até meados do século passado. (Kirkwood *et al.*, 2012)

A investigação na área das vacinas terapêuticas para o cancro da mama iniciou-se há cerca de 20 anos atrás. De facto, foi demonstrado já em 1999, que a injeção, por via intradérmica, de um antigénio tumoral peptídico, associado a um adjuvante, poderia induzir uma resposta imune primária contra esse antigénio/proteína e, posteriormente, uma

propagação de epítomos, o que se traduz numa resposta imune aumentada para outros epítomos associados ao tumor. (Monnot e Romero, 2017) Estas descobertas fomentaram grandes esperanças para a formulação de uma vacina terapêuticamente eficaz.

Atualmente, um vasto número de estratégias utilizando vacinas para o cancro da mama está sob investigação, para determinação da sua eficácia clínica, segurança e toxicidade, apesar de ainda não existir nenhuma aprovada pela FDA. No entanto, em 2011, a agência aprovou a primeira vacina como terapia para o cancro da próstata, a *sipuleucel-T*, um tipo de imunoterapia autóloga, que permite aumentar o tempo de sobrevivência dos doentes com cancro da próstata. (Li, X. e Bu, 2017) A primeira aprovação regulamentar foi, sem dúvida, um marco na história das vacinas terapêuticas, o que criou expectativas sobre a possível aprovação, no futuro, de vacinas para outros cancros, como o cancro da mama.

Até ao momento, as técnicas desenvolvidas para o cancro da mama nesta área são, principalmente, vacinas contendo um ou mais antigénios específicos do cancro da mama. Estes antigénios podem ser veiculados de diversas formas, incluindo peptídeos, vetores virais recombinantes, lisados ou a totalidade de células tumorais, plasmídeo de DNA, ou células dendríticas (*Dendritic Cells* - DCs) estimuladas diretamente. (Bryson *et al.*, 2017)

Foram lançados, até 2017, mais de 20 ensaios clínicos direcionados para diferentes epítomos tumorais, usando diferentes vias de administração e substâncias de imunização, como se pode observar na tabela I. (Monnot e Romero, 2017)

#### **5.4.1. DESENVOLVIMENTO DE VACINAS**

O desenvolvimento de uma vacina terapêutica envolve não só a seleção do tipo de antigénio a utilizar, mas também a forma de o integrar na vacina – sistema de entrega de vacinas -, bem como a escolha dos adjuvantes, vetor de entrega e via de administração.

Os adjuvantes das vacinas terapêuticas podem ser agentes imunológicos ou farmacológicos, cuja função é modular os efeitos de outros constituintes da vacina. Estes são úteis no redirecionamento da resposta imune celular para os antigénios veiculados na vacina, uma vez que (i) permitem o armazenamento de antigénios para libertação prolongada, (ii) conferem proteção contra a degradação, (iii) potenciam a captação de antigénios pelas APCs, e (iv) proporcionam a criação de um ambiente pró-inflamatório e pró-imunogénico. (Yu *et al.*, 2017)

O fator estimulante de colónias de macrófagos-granulócitos (GM-CSF) é uma citocina amplamente utilizada em várias vacinas para o cancro, por ser um potente adjuvante imune.

Este agente imunomodulador desempenha um papel crucial na promoção da diferenciação, maturação e recrutamento de DCs e na potenciação da apresentação de antígenos a linfócitos auxiliares TCD4+ e apresentação cruzada a linfócitos citotóxicos TCD8+. (Li, X. e Bu, 2017)

Os principais sistemas de entrega de vacinas utilizados passam por estratégias não celulares, à base de peptídeos, e estratégias celulares à base de células dendríticas, que se subdividem em extratos de lisados tumorais ou de células dendríticas geneticamente modificadas. Existem também outras formas de vacinas terapêuticas, como as vacinas de DNA/RNA e as vacinas à base de células tumorais totais

## **5.4.2. SISTEMAS DE ENTREGA DE VACINAS**

### **5.4.2.1. VACINAS DE DNA/RNA**

A utilização de um vírus como sistema de entrega de antígenos nas vacinas terapêuticas representa uma técnica potencialmente eficiente de gerar uma resposta imune completa, que envolva ambas as componentes inata e adaptativa do sistema imunitário e de induzir memória imune duradoura. (Yuan *et al.*, 2017) É uma abordagem apelativa devido à relação custo-eficácia, segurança e estabilidade. (Li, X. e Bu, 2017)

As vacinas de DNA/RNA baseiam-se na utilização de vetores que codificam TAA/TSA, tais como partículas virais, bactérias não patogênicas ou leveduras. Estas vacinas podem constituir fontes de TAA, no caso das bactérias e leveduras, ou exercer uma ação moduladora das APCs, transformando-as, no caso dos vetores virais. Dentro deste grupo incluem-se as vacinas oncolíticas, constituídas por vírus oncolíticos geneticamente modificados de forma a codificarem o TAA pretendido. (Galluzzi *et al.*, 2014) Como exemplo deste tipo de vacinas temos a vacina terapêutica PANVAC, constituída essencialmente por um vetor viral pox-vírus contendo transgenes de antígenos associados ao tumor (MUC-I e CEA), sobreexpressos em vários carcinomas, incluindo no cancro da mama. (Hu e Mcarthur, 2018)

### **5.4.2.2. VACINAS À BASE DE CÉLULAS TUMORAIS**

As vacinas à base de células tumorais totais constituem outra estratégia de indução da resposta imune através de TAA/TSA, sendo que estas células podem ser do próprio paciente (autólogas) ou de uma cultura celular (alógenicas). As células tumorais são geneticamente modificadas, através de um processo de transdução mediado por vírus, para expressarem citocinas imunoestimuladoras ou moléculas co-estimuladoras, com vista a potenciar o efeito da vacinação. Um dos exemplos desta técnica é a vacina celular alógena GVAX, direcionada para o HER2 e constituída por células tumorais geneticamente modificadas para segregarem GM-CSF. (Hu e Mcarthur, 2018; Li, X. e Bu, 2017)

As vacinas de DNA e à base de lisados ou de células tumorais totais, têm sido desenvolvidas com base na premissa de ampliação da citotoxicidade a outros epítomos e antígenos tumorais. Contudo, a investigação clínica sobre estas vacinas tem sido menos extensa (Costa *et al.*, 2017), razão pela qual a presente monografia se foca nos estudos de eficácia envolvendo vacinas à base de peptídeos e de células dendríticas.

#### **5.4.2.3. VACINAS À BASE DE PEPTÍDEOS**

Um dos principais métodos utilizados no desenvolvimento de vacinas para o cancro é a administração de proteínas ou antígenos recombinantes, por via intramuscular, subcutânea ou intradérmica, em associação com um ou mais adjuvantes imunoestimuladores, que promovam a maturação das DCs. A fundamentação desta abordagem é que as DCs residentes e outras APCs adquirem a capacidade de apresentar epítomos derivados de antígenos tumorais, ao longo do seu processo de maturação, conseguindo desta forma originar uma resposta imune robusta, específica para esse antígeno. (Galluzzi *et al.*, 2014)

Assim, as vacinas à base de peptídeos utilizam epítomos imunogénicos derivados de TAA/TSA, de forma a reforçar a ativação dos CTL CD8+, linfócito T auxiliares CD4+ e a produção de anticorpos pelas células B, sendo que os CTL ativados adquirem a capacidade de reconhecer e combater as células cancerígenas. (Li, X. e Bu, 2017)

A capacidade do peptídeo TAA/TSA se ligar ao MHC e a posterior ligação deste complexo peptídeo-MHC classe I/II ao recetor da célula T (TCR), são as principais etapas envolvidas no desenvolvimento da resposta mediada pelos linfócitos T. A forma mais comum de apresentação dos peptídeos aos linfócitos T citotóxicos CD8+ é através do MHC classe I, apesar de existirem pequenos subgrupos de epítomos de TAA que são apresentados pelo MHC classe II às células T CD4+ auxiliares. (Li, X. e Bu, 2017) Enquanto que pequenos peptídeos (8 a 12 aminoácidos) se ligam diretamente às moléculas MHC expressas à superfície das APCs, os peptídeos sintéticos longos (25 a 30 aminoácidos) sofrem endocitose e são processados no interior das células para serem então apresentados pelas APCs com vista a desencadear uma resposta imune. A atividade terapêutica destes peptídeos longos é superior à dos seus pequenos congéneres, especialmente quando estes incluem epítomos reconhecidos tanto por células T auxiliares como citotóxicas. (Chodon *et al.*, 2015)

São vários os ensaios clínicos a decorrer com vacinas terapêuticas à base de peptídeos, em doentes com cancro da mama, como se pode observar na tabela 2. A escolha do peptídeo/antígeno tumoral a utilizar é a base do desenvolvimento deste tipo das vacinas, que se dividem assim em dois grupos principais: vacinas derivadas do antígeno HER2 e vacinas

derivadas da MUC1, podendo utilizar-se apenas um peptídeo derivado destes antígenos ou vários (vacinas multipeptídicas).

### **Vacinas Peptídicas derivadas do HER2**

A NeuVax é uma vacina peptídica disponível comercialmente, constituída pelo peptídeo E75 do HER2 e pelo adjuvante GM-CSF, que foi desenvolvida com o objetivo de diminuir as recidivas em pacientes com cancro da mama HER2-, não elegíveis para a terapia com o anticorpo monoclonal Trastuzumab. (Li, X. e Bu, 2017; Monnot e Romero, 2017) A sua segurança foi recentemente demonstrada num ensaio clínico de fase I/II, e os resultados de eficácia indicam um aumento da sobrevivência global nos doentes que receberam a dose otimizada da vacina. Apesar de ser apenas constituída por um epítopo do cancro da mama, foi demonstrado que a vacinação com NeuVax induz a difusão de outros epítomos, derivada da lise de células cancerígenas e subsequente inflamação, verificando-se um aumento do nível de células T citotóxicas para dois outros epítomos. Atualmente está a decorrer um ensaio clínico de fase III para determinar qual a dose otimizada e a eficiência da vacina. (Monnot e Romero, 2017)

A vacina GP2 foi a segunda vacina derivada do HER2 a surgir, constituída pelo peptídeo GP2. Este peptídeo derivado do domínio transmembranar da HER2, é altamente imunogénico, o que o torna num ótimo recurso para a vacinação, especialmente em pacientes com cancro da mama com expressão do antígeno leucocitário humano A2 (*Human Leukocyte Antigen – HLA*). (Li, X. e Bu, 2017)

Outro dos peptídeos usado em vacinas para o cancro da mama foi o A37, um peptídeo híbrido derivado do domínio intracelular do HER2, desenvolvido para ativar linfócitos auxiliares TCD4+. O primeiro ensaio clínico de fase I com esta vacina híbrida A37, em doentes com cancro da mama, demonstrou que esta é segura e tolerável. Demonstrou-se ainda que tem a capacidade de estimular uma resposta imunitária específica e duradoura, mediada por linfócitos TCD4+, mesmo na ausência de um adjuvante imune, evidenciando um possível potencial para a prevenção de recidivas. (Li, X. e Bu, 2017)

### **Vacinas Peptídicas derivadas da MUC1**

Como já foi referido anteriormente, a forma hipoglicosilada da MUC1 encontra-se sobreexpressa nas células do cancro da mama, o que estimula uma resposta por linfócitos T e B em doentes com cancro da mama no estadio inicial. As repostas correlacionadas com a MUC1 estão, geralmente, associadas a resultados favoráveis, sendo que este antígeno tem ainda a vantagem de poder ser usado em pacientes com qualquer tipo de genótipo para o

HLA. Atualmente está a decorrer um estudo para determinar a eficácia de uma vacina de conjugação da MUC-I e do poly-IC, em pacientes com TNBC. (Li, X. e Bu, 2017)

### **Vacina peptídica sTn-KLH**

O Sialy-Tn (sTn) é um epítopo carbohidratado identificado em várias glicoproteínas expressas em diferentes tipos de tumores, incluindo o cancro da mama, que desempenha um papel importante no processo de proliferação e metastização das células cancerígenas. Esta vacina peptídica resulta da conjugação deste antigénio com a hemocianina KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) e do adjuvante imune QS-21. (Li, X. e Bu, 2017)

#### **5.4.2.4. VACINAS À BASE DE CÉLULAS DENDRÍTICAS**

O interesse pela utilização das DCs em vacinas terapêuticas está relacionado com o papel crucial que estas desempenham na interface entre imunidade inata e adaptativa, e pela sua capacidade de desencadear uma resposta antitumoral robusta e terapeuticamente relevante. (Galluzzi *et al.*, 2014)

As DCs, as principais células apresentadoras de antigénios, têm a capacidade de capturar, processar e apresentar antigénios aos linfócitos, bem como de estimular ambas as componentes do sistema imunitário - inata e adaptativa. Estas células expressam várias proteínas co-estimuladoras membranares, tais como a CD80 e CD86, que orientam a resposta dos linfócitos T, e produzem citocinas necessárias à ativação dos mesmos, tais como a IL-12. (Galluzzi *et al.*, 2014; Li, X. e Bu, 2017) Assim, a sua ação baseia-se na libertação de sinais coestimuladores, que resulta na ativação de linfócitos T CD8+ e T CD4+, que por sua vez promovem uma resposta imune contra antigénios tumorais. (Costa *et al.*, 2017)

De um modo geral, a estratégia das vacinas à base de DCs passa pela inserção *ex vivo* de células tumorais totais ou de antigénios definidos, em células dendríticas autólogas, seguida de inoculação no doente. Estas vacinas dependem, assim, do poder das DCs em apresentar antigénios e promover uma resposta imune. (Yu *et al.*, 2017)

Existem várias técnicas de modificação de células dendríticas, sendo que a maioria envolve o isolamento de monócitos circulantes provenientes do doente e a sua diferenciação *ex-vivo*, na presença de agentes promotores da maturação das DCs, tais como o GM-CSF. Estas DCs autólogas são administradas aos doentes oncológicos após (i) modificação por terapia génica ou (ii) exposição ao antigénio tumoral sob a forma de proteína, peptídeo, mRNAs, vetores virais recombinantes codificantes de TA ou lisados de células tumorais. Estas células dendríticas estimuladas pelos TA são depois capazes de induzir a expansão de linfócitos T CD4+ e CD8+ específicos dos antigénios por elas apresentados, após vacinação,

desencadeando uma resposta imune *in vivo* direcionada ao tumor. (Banchereau e Jacques, 2013; Chodon *et al.*, 2015) A maturação das DCs é um passo crucial uma vez que células dendríticas imaturas exercem uma função imunossupressora, em vez imunoestimulante, como se pretende. (Galluzzi *et al.*, 2014)

Estudos realizados em murganhos demonstraram evidência da imunidade antitumoral induzida pela vacinação à base de células dendríticas e em ensaios clínicos foi, de facto, observada a rejeição do tumor, mediada pela vacinação com DCs. Atualmente, estão a decorrer diversos ensaios clínicos em doentes com cancro da mama, com vacinas terapêuticas à base de DCs, como se pode observar na tabela 3. (Li, X. e Bu, 2017)

#### **5.4.2.4.1. MODIFICAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS**

Como foi referido anteriormente, as DCs são geradas *ex vivo* através da cultura de células estaminais hematopoiéticas ou monócitos, com citocinas que estimulem a sua diferenciação e maturação. Estas células são manipuladas através da exposição a antigénios tumorais ou de técnicas de terapia génica. (Banchereau e Jacques, 2013)

#### **EXPOSIÇÃO A ANTIGÉNIOS TUMORAIS**

O mecanismo mais comum para a modificação de DCs é a exposição destas células a lisados tumorais. A fusão de células dendríticas com células tumorais totais ou com os correspondentes lisados, permite que estas sejam expostas a um amplo espectro de TAA. Estes antigénios são processados endogenamente pelas DCs e posteriormente apresentados na sua superfície a partir dos MHC classe I e II, o que resulta na ativação simultânea de linfócitos T CD4+ e CD8+. (Koido, 2016)

A vacinação com células dendríticas expostas, por exemplo, ao HER2 intensifica a imunidade direcionada para este antigénio pelo aumento de produção de IL-12, que por sua vez influencia o fenótipo dos linfócitos T, levando-os a segregar INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  *in vivo*. (Costa *et al.*, 2017) Contudo, apesar do potencial teórico desta abordagem, estudos pré-clínicos realizados em diferentes modelos animais, indicam que estas DCs carregadas com TAA não promovem uma proteção completa contra todos os mecanismos de desenvolvimento tumoral, após vacinação. (Abdellateif *et al.*, 2018)

#### **TERAPIA GÉNICA**

Outra das técnicas para a obtenção de vacinas à base de DCs é a administração de DCs autólogas ou alogénicas amplificadas, diferenciadas e geneticamente modificadas *ex vivo*. Aqui, ao contrário da abordagem anterior, as células não são carregadas com os TAA, mas sim modificadas de forma a expressarem antigénios tumorais ou moléculas

imunoestimuladoras, através da transferência de genes por intermédio de vetores virais ou por transfeção de material genético com mRNA. (Galluzzi *et al.*, 2014)

A transferência de genes pode ser feita através de diferentes vetores virais, dos quais se destacam os adenovírus e retrovírus, vetores altamente eficientes na modificação genética das DCs e amplamente utilizados nos ensaios clínicos. Os lentivírus, poxvírus, vírus herpes e vírus adeno-associados são outros dos vetores utilizados para a expressão de transgenes em DCs. A transfeção de RNA ou DNA é feita através da encapsulação destas moléculas em imunolipossomas direcionados para as DCs que se ligam seletivamente às mesmas. (Galluzzi *et al.*, 2014; Koido, 2016)

Esta técnica de modificação é uma alternativa com potenciais vantagens sobre a modificação através do “carregamento” de DCs com proteínas ou peptídeos antigénicos, permitindo a obtenção de níveis elevados de expressão constitutiva do antígeno tumoral ou incorporação de genes que aumentem a capacidade imunoestimuladora das DCs. (Koido, 2016)

### **5.4.3. APRESENTAÇÃO DE ESTUDOS DE EFICÁCIA**

#### **5.4.3.1. ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS**

##### **VACINAS PEPTÍDICAS**

Um estudo desenvolvido por (Rosenthal *et al.*, 2017), envolvendo uma vacina com o epítipo J-HER do antígeno HER2, demonstrou a capacidade deste peptídeo em prevenir e limitar o crescimento e disseminação tumoral do cancro da mama, num modelo de murganho. Este epítipo foi escolhido pela sua capacidade em promover respostas imunitárias mediadas por linfócitos T CD8+ e CD4+. Neste estudo, após administração em regime profilático, este peptídeo retardou o desenvolvimento do tumor em, pelo menos, 48 dias, após a indução do desenvolvimento tumoral. A administração terapêutica da vacina limitou a progressão e propagação tumoral, e, conseqüentemente, a morbidade e mortalidade do tumor no animal. Isto constitui evidência para a utilização desta vacina, em ensaios clínicos, como terapia adjuvante pós-cirúrgica, para prevenção da ocorrência de recidivas.

##### **VACINAS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS**

O estudo realizado por (Qin *et al.*, 2018) demonstrou ação apoptótica sobre a linha celular 4T1 do cancro da mama, mediada por uma vacina à base de células dendríticas geneticamente modificadas. Estas células foram obtidas após incubação com a linha celular 4T1 imunizada com MUC1-CRT (em que a calreticulina, CRT, promove a translocação da MUC1

para a superfície das células tumorais 4T1) e silenciamento do supressor de sinalização de citocinas 1 (*suppressor of cytokine signaling 1* - SOCS1). No ensaio *in vivo* promoveram ainda atividade antitumoral específica contra o antígeno MUC1, evidenciada pela maior produção de citocinas e proliferação de linfócitos T.

Um estudo pré-clínico envolvendo a associação de um antagonista da adenosina (mediador inflamatório) e de um inibidor da CD73 (molécula envolvida no mecanismo de sinalização pela adenosina) com uma vacina dendrítica resultou na diminuição do crescimento tumoral, na potenciação das respostas antitumorais específicas e na sobrevivência prolongada de murganhos portadores de tumores. A inflamação é crucial para a progressão tumoral, sendo que a presença de altas concentrações de adenosina nos tecidos tumorais, leva à alteração das funções das células imunes. Assim, esta associação sinérgica foi desenvolvida no sentido de potenciar a ação da vacina, uma vez que a presença de mediadores imunossupressores no microambiente tumoral, tais como a adenosina, diminuem a eficácia da imunoterapia mediada por células dendríticas. (Arab *et al.*, 2017)

#### **5.4.3.2. ENSAIOS CLÍNICOS**

##### **VACINAS PETÍDICAS**

Uma vacina multipeptídica constituída por 9 peptídeos de restrição do MHC classe I (MAGE-A1,-A3 e -A10, CEA, NY-ESO-1, e peptídeos derivados do HER2+) associados ao cancro da mama foi combinada com um agonista do TLR3, o poly-ICLC, e com um peptídeo auxiliar derivado do toxoide tetânico, com vista a avaliar a sua imunogenicidade, num contexto de terapia adjuvante pós-cirúrgica, em pacientes com cancro da mama em estadio inicial. (Dillon *et al.*, 2017)

Um dos componentes chave para obter uma vacina terapêutica eficaz é a utilização de adjuvantes funcionais que potenciem a capacidade das DCs de gerar respostas imunes específicas. Os agonistas dos recetores *toll-like* (*Toll-Like Receptor*, TLR) são excelentes adjuvantes, uma vez que os seus alvos estão presentes na superfície de células do sistema imunitário, tal como acontece com o TLR3, presente na superfície de DCs. Este recetor, quando estimulado, leva à ativação das DCs, o que resulta na produção de citocinas e sobreexpressão de recetores co-estimuladores, que por sua vez desencadeiam uma resposta imune vigorosa pelas células T. Por outro lado, o peptídeo auxiliar usado neste ensaio tem como propósito estimular os linfócitos T auxiliares CD4+ auxiliares a expressarem a molécula CD40L, que por sua vez estimula uma resposta imune pelas DCs após ligação ao CD40 presente na superfície destas. (Dillon *et al.*, 2017)

O ensaio clínico acima descrito foi realizado numa amostra de dez doentes, cinco com cancro da mama com sobreexpressão de HER2+ e cinco com cancro da mama com expressão de ER (Luminal A ou B), onde foi avaliada a imunogenicidade da vacina mipeptídica através da resposta mediada pelas células T CD8+. Os peptídeos CEA e MAGE-AI foram os mais imunogénicos, sendo que os resultados demonstraram que a vacina é viável e segura e que a sua combinação com os adjuvantes usados (poly-ICLC e o peptídeo auxiliar) resultou numa estimulação imune moderada. (Dillon *et al.*, 2017)

Um ensaio clínico de fase II realizado por Mittendorf e colaboradores (2016), envolvendo a administração da vacina peptídica GP2 em diferentes grupos de doentes com tumores positivos para HER2, teve como objetivo a determinação da eficácia da vacina na prevenção da recorrência do tumor. A amostra de doentes usada foi heterogénea, englobando doentes com cancro da mama sem evidência clínica da doença, com nódulos positivos e com ausência de nódulos, mas com elevado risco de desenvolver a doença. Estes foram divididos em dois grupos, sendo que o grupo de estudo foi imunizado com o peptídeo GP2 em associação com o adjuvante GM-CSF e o grupo de controlo apenas com GM-CSF. Os resultados não evidenciaram benefício clínico face à vacinação, pelo que este foi um ensaio negativo. Contudo, alguns dos resultados obtidos indicam que este tipo de vacinação pode ter elevada atividade clínica em populações mais específicas, especialmente no subtipo de sobreexpressão de HER2+. Um outro ensaio de fase I/II, realizado por este grupo, com uma vacina peptídica do E75, como terapêutica adjuvante na prevenção da recorrência do cancro da mama, obteve melhores resultados, sendo que a taxa de sobrevivência livre de doença aos 5 anos foi maior no grupo de estudo (90%), em comparação com o grupo de controlo não vacinado (80%). (Mittendorf *et al.*, 2016)

Por fim, Curigliano e colaboradores (2016) desenvolveram um ensaio clínico de fase I/II cujo objetivo foi a determinação da segurança, eficácia clínica e imunogenicidade de uma vacina peptídica contendo o dHER2 - peptídeo recombinante de HER2 - e o imunoestimulante AS15, em doentes com cancro da mama metastático HER2+. O peptídeo dHER2 resulta da combinação do domínio extracelular do HER2 com uma porção do seu domínio intracelular. Os resultados obtidos indicam que esta vacina é segura e que induz atividade imunitária, uma vez que após imunização, foi detetada uma resposta humoral específica para cada um dos domínios da proteína, em todos os pacientes que não tinham recebido tratamento prévio com trastuzumab. Vários pacientes atingiram ainda resposta completa, resposta parcial ou estado de doença estável, após vacinação. (Curigliano *et al.*, 2016)

## VACINAS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

Um ensaio clínico realizado por (Lowenfeld *et al.*, 2018) demonstrou que o tratamento de doentes com carcinoma ductal *in situ* (DCis) e cancro da mama invasivo em estadio inicial, com uma vacina à base de células dendríticas pulsadas com o HER2, desencadeou nos doentes uma resposta imune específica contra HER2, mediada por linfócitos T. A taxa de resposta completa foi maior nos doentes com DCis (28,6%), comparando com os portadores de cancro invasivo (8,3%). Todos os pacientes que atingiram resposta completa evidenciaram imunidade anti-HER2 mediada por linfócitos T CD4+ no gânglio sentinela.

### 5.5. COMBINAÇÃO DE TERAPIAS: O FUTURO

Até à data, a maioria das terapias existentes demonstraram uma eficácia limitada quando usadas individualmente. Um problema recorrente é o facto de os tumores eventualmente apresentarem recidivas, apesar de responderem bem ao tratamento direcionado, numa fase inicial. A natureza complexa do cancro, refletida pela elevada heterogeneidade genómica e antigénica, a nível intra e intertumoral, e pelo microambiente tumoral imunossupressor, enfatiza a necessidade de se investir numa imunoterapia personalizada e direcionada, com vista a manipular o próprio sistema imune do doente contra o cancro. (Chodon *et al.*, 2015; Monnot e Romero, 2017)

De facto, as células cancerígenas são altamente adaptáveis, conseguindo mutar e evoluir rapidamente, com vista a escapar às alterações do ambiente envolvente. Assim, para atingir uma cura bem-sucedida, duradoura e robusta é essencial proceder a uma abordagem multifacetada, através da combinação de terapias que envolvam diferentes vias para atingir o microambiente tumoral, com vista a minimizar a imunossupressão induzida por este, e dando menos tempo e oportunidades ao tumor para escapar. (Chodon *et al.*, 2015; Monnot e Romero, 2017) O cenário mais provável é que as imunoterapias de próxima geração irão passar por estratégias multimodais, direcionadas para diferentes alvos-chave nesta interação dinâmica entre sistema imune e células cancerígenas. (Li, L. *et al.*, 2017) A combinação entre diferentes estratégias de imunoterapia ativa permite a ativação concomitante de respostas imunes específicas contra o tumor e a inativação da imunossupressão do microambiente tumoral, resultando numa indução reforçada de respostas antitumorais. (Tanaka *et al.*, 2017)

O desenvolvimento de vacinas terapêuticas eficazes para o cancro da mama apresenta um sucesso limitado devido também à existência de diferentes subtipos, que variam em morfologia, biologia, comportamento e resposta à terapêutica. (Abdellateif *et al.*, 2018) A

disponibilidade de antígenos associados a carcinomas mamários e o avanço tecnológico na formulação de vacinas e dos seus adjuvantes permite, atualmente, testar a eficácia das vacinas terapêuticas em doentes com cancro da mama como terapia adjuvante. No entanto, o design de ensaios clínicos para determinar rigorosamente a sua eficácia é, ainda, muito desafiante, principalmente, no cancro da mama avançado. (Monnot e Romero, 2017)

O panorama futuro envolve, assim, a combinação das vacinas com outras técnicas de imunoterapia, como a administração de anticorpos monoclonais ou inibidores dos *checkpoints* imunes, com vista a obter uma resposta antitumoral potente e benefícios clínicos duradouros. (Li, X. e Bu, 2017)

## **6. CONCLUSÃO**

O cancro da mama constitui, sem dúvida, um problema de saúde pública mundial, que afeta principalmente mulheres e cujo tratamento eficaz e duradouro permanece, ainda, um desafio. Esta é uma doença altamente complexa, dividida em diferentes subtipos moleculares, e cujo elevado grau de heterogeneidade se reflete nas suas diferentes manifestações clínico-patológicas. Esta é uma das particularidades do cancro da mama que torna o tratamento ainda mais desafiante, uma vez que o sucesso da terapêutica depende das características intrínsecas de cada tumor, sendo difícil encontrar um tratamento padrão. O caminho é apostar nas terapêuticas direcionadas, que têm em conta as características inerentes a cada subtipo tumoral.

Assim, as vacinas terapêuticas para o cancro surgem como uma das estratégias mais promissoras. Baseadas numa terapia direcionada para os antígenos específicos de cada tumor, permitem uma abordagem personalizada da doença, suportada pelo próprio sistema imune do doente. O objetivo final é desencadear ou potenciar uma resposta imune pré-existente, estimulando o sistema imunitário do próprio doente a combater o tumor.

O caminho a percorrer ainda é longo, uma vez que tem sido difícil traduzir o potencial destas vacinas em ensaios clínicos bem-sucedidos, com boa evidência de eficácia clínica. Contudo, atualmente estão a decorrer diversos ensaios clínicos com vacinas terapêuticas, a maioria em terapias de combinação. O panorama futuro aponta para uma mudança no paradigma do tratamento do cancro da mama, que trará grandes benefícios para os doentes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELLATEIF M. S., SHAARAWY S.M., KANDEEL E. Z., EL-HABASHY A. H., SALEM M. L., EL-HOUSEINI M. E. **A novel potential effective strategy for enhancing the antitumor immune response in breast cancer patients using a viable cancer cell-dendritic cell-based vaccine.** *Oncology Letters.*, 16 (2018), 529–535.
- American Cancer Society. ACS, Breast Cancer, About Breast Cancer. 2018. <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>. Acesso a 5 de Julho de 2018.
- AKRAM M., IQBAL M., DANİYAL M., KHAN A. U. **Awareness and current knowledge of breast cancer.** *Biological research.*, 50 (2017).
- ARAB S., KHESHTCHIN N., AJAMI M., ASHURPOOR M., SAFVATI A., NAMDAR A., MIRZAEI R., NIRI N. M., JADIDI-NIARAGH F., GHAHREMANI, M. H. - **Increased efficacy of a dendritic cell-based therapeutic cancer vaccine with adenosine receptor antagonist and CD73 inhibitor.** *Tumor Biology.*, 39 (2017), 1–8.
- BANCHEREAU K., JACQUES P. **Cancer immunotherapy via dendritic cells.** *Nature Reviews Cancer.*, 12 (2013), 265–277.
- BATES J. P., DERAKSHANDEH R., JONES L., WEEB T. J. **Mechanisms of immune evasion in breast cancer.** *BMC Cancer.*, 18 (2018).
- BRYSON P. D., HAN, X., TRUONG N., WANG P. **Breast cancer vaccines delivered by dendritic cell-targeted lentivectors induce potent antitumor immune responses and protect mice from mammary tumor growth.** *Vaccine.*, 35 (2017), 5842–5849.
- CHEN D. S., MELLMAN I. **Review Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle.** *Immunity.*, 39 (2013), 1–10.
- CHODON T., KOYA R. C., ODUNSI K. **Active Immunotherapy of Cancer.** *Immunological Investigations.*, 44 (2015), 817–836.
- COSTA R. L. B., SOLIMAN H., CZERNIECKI B. J. **The clinical development of vaccines for HER2+breast cancer: Current landscape and future perspectives.** *Cancer Treatment Reviews.*, 61 (2017) 107–115.
- CURIGLIANO G., ROMIEU G., CAMPONES M., DORVAL T., DUCKS L., CANON J., ROEMER-BECUWE C., ROSELLIS M., NECIOSUP S., BURNY W., CALLEGARO A., ALVES P. M. S., LOUAHED J., BRICHARD V., LEHMANN F. **A phase I / II trial of the safety and clinical activity of a HER2-protein based immunotherapeutic for treating women with HER2-positive metastatic breast cancer.** *Breast Cancer*

Research and Treatment., 156 (2016), 301–310.

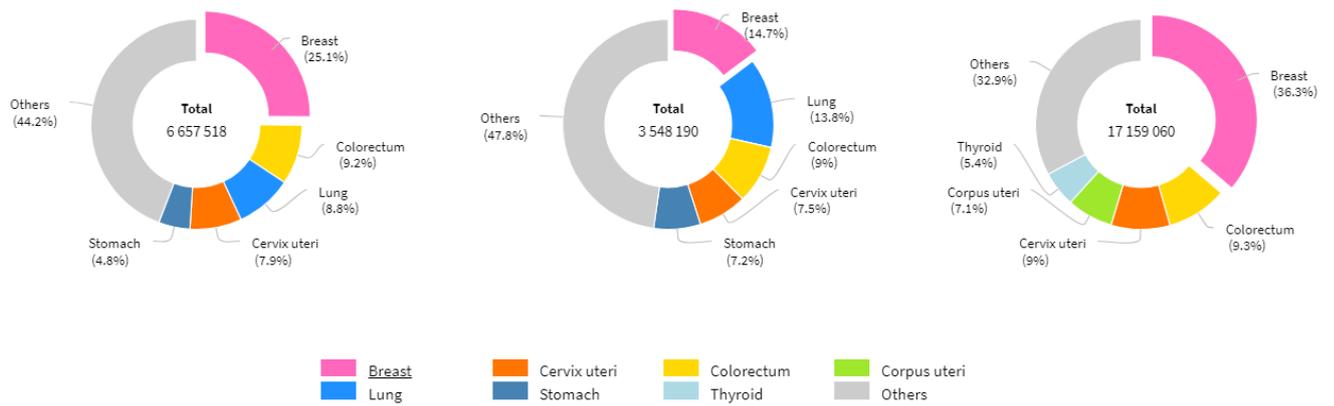
- DILLON P. M., PETRONI G. R., SMOLKIN M. E., BRENIN D. R., CHIANESE-BULLOCK A. C., SMITH K. T., OLSON W. C., FANOUS I. S., NAIL C. J., BRENIN C. M., HALL E. H., SLINGLUFF C. L. - **A pilot study of the immunogenicity of a 9-peptide breast cancer vaccine plus poly-ICLC in early stage breast cancer.** *Journal for Immunotherapy of Cancer.* (2017).
- GALLUZZI L., VACCHELLI E., PEDRO J. B., BUQUÉ A., SENOVILLA L., BARACCO E. E., BLOY., CASTOLDI F., ABASTADO J., AGOSTINIS P., APTE R. N., ARANDA F., AYYOUB M., BECKHOVE P., CELIS J. E., CERUNDOLO V., CLAYTON A., COLOMBO M. P., COUSSENS L., DHODAPKAR M. V., EGGERMONT A. M., GALON D. T., GARG A., GHIRINGHELLI F., GIACCONE G., GILBOA E., GNJATIC S., HOOS A., HOSMALIN A., JÄGER D., KALINSKI P., KÄRRE K., KEEP O., KIESSLING R., KIRKWOOD J. M., KLEIN E., KNUTH A., LEWIS C. E., LIBLAU R., LOTZE M. T., LUGLI E., MACH J., MATTEI F., MAVILIO D., MELERO I., MELIEF C. J., MITTENDORF E. A., MORETTA L., ODUNSI A., OKADA H., PALUCKA A. K., PETER M. E., PIENTA K. J., PORGADOR A., PRENDERGAST G. C., RABINOVICH G. A., RESTIFO N. P., RIZVI N., SAUTÈS-FRIDMAN C., SCHREIBER H., SELIGER B., SHIKU H., SILVA-SANTOS B., SMYTH M. J., SPEISER D. E., SPISEK R., SRIVASTAVA P. K., TALMADGE J. E., TARTOUR E. BURG S. H. V. D., WEBER, WHITESIDE T. L., WOLCHOK J. D., ZITVOGEL L., ZOU W., KROEMER G. **Classification of current anticancer immunotherapies.** *Oncotarget.*, 5 (2014), 12472–12508.
- HU Z. I., MCARTHUR H. L. **Immunotherapy in Breast Cancer : the New Frontier.** *Current Breast Cancer Reports.*, 10 (2018), 35–40.
- KIRKWOOD J. M., BUTTERFIELD L H., TARHINI A. A., ZAROOR H., KALINSKI P., FERRONE S. **Immunotherapy of Cancer in 2012.** *National Institute of Health.*, 62 (2012), 309–335.
- KOIDO, S. **Dendritic-Tumor Fusion Cell-Based Cancer Vaccines.** *International Journal of Molecular Sciences.*, 17 (2016), 1–16.
- LI L., GOEDEGEBUURE S. P., GILLANDERS W. E. **Preclinical and clinical development of neoantigen vaccines.** *Annals of Oncology.*, 28 (2017), xii11-xii17.
- LI X. BU X. **Progress in Vaccine Therapies for Breast Cancer.** In: Song E., Hu H. *Translational Research in Breast Cancer.* Singapore: Springer, 2017. ISBN: 978-981-10-6020-5. p. 315–330.
- LING B., WATT K., BANERJEE S., NEWSTED D., TRUESDELL P., ADAMS J., SIDHU S. S., CRAIG A. W. B. **A novel immunotherapy targeting MMP-14 limits hypoxia ,**

- immune suppression and metastasis in triple-negative breast cancer models.** *Oncolimmunology.*, 8 (2017), 58372–58385.
- LOWENFELD L., MICK R., DATTA J., XU S., FITZPATRICK E., FISHER C. S., FOX K. R., DEMICHELE A., ZHANG P. J., WEINSTEIN S. P., ROSES R. E., CZERNIECKI B. J., **Dendritic Cell Vaccination Enhances Immune Responses and Induces Regression of HER2 pos Ductal Carcinoma In Situ Independent of Route : Results of Randomized Selection Design Trial.** *Clinical Cancer Research.*, 23 (2018), 2961–2971.
  - MCCLURE J. S., GREGORY K. M., KUMAR R., SHEAD D. A., HANISCH L. J., SIDIROPOULOU Z. **Cancro da mama: Linhas de orientação NCCN para doentes.** Traduzido por: LOURENÇO C., ARAÚJO A. V., SOUSA M., BUENO M. D., FELIX A., PEREIRA V. National Comprehensive Cancer Network. (2011)
  - MEHRABI M., MANSOURI K., SOLYMANI B., HOSSEIN-KHANI Z., SHAHLAIE M., KHODARAHMI R. **Development of a human epidermal growth factor derivative with EGFR-blocking and depleted biological activities: A comparative in vitro study using EGFR-positive breast cancer cells.** *International Journal of Biological Macromolecules.*, 103 (2017), 275–285.
  - MITTENDORF E. A., ARDAVANIS A., LITTON J. K., SHUMWAY N. M., HALE D. F., MURRAY J. L., PEREZ S. A., PONIAH S., BAXEVANIS C. N., PAPAMICHAIL M., PEOPLES G. E. **Primary analysis of a prospective , randomized , single-blinded phase II trial evaluating the HER2 peptide GP2 vaccine in breast cancer patients to prevent recurrence.** *Oncotarget.*, 7 (2016), 66192–66201.
  - MONNOT G. C., ROMERO P., **Rationale for immunological approaches to breast cancer therapy.** *The Breast.*, 37 (2017) 187–195.
  - QIN S., GAO Z., LIU Y., LIU C., WANG J., ZOU L. L. **Silencing of suppressor of cytokine signaling 1 enhances the immunological effect of mucin 1 - calreticulin - primed 4T1 cell - treated dendritic cells in breast cancer treatment.** *Oncology Letters.*, 15 (2018), 1630–1638.
  - REBELO, JENNA; WONG, ERIC. **Breast Cancer Pathogenesis and histological vs. Molecular subtypes.** *McMaster Pathophysiology Review* [Em linha], atual. 2012. [Acedido em 05 de jul de 2018]. Disponível em WWW:<URL: <http://www.pathophys.org/breast-cancer/breastcancer-copy/>
  - ROSARIA B., DELL'AVERSANA C., GIORGIO C., ASTORRI R., ALTUCCI L. **Breast Cancer Vaccines : New Insights.** *Frontiers in Endocrinology.*, 8 (2017), 1–7.
  - ROSENTHAL K. S., STONE S., KOSKI G., ZIMMERMAN D. H. **LEAPS Vaccine**

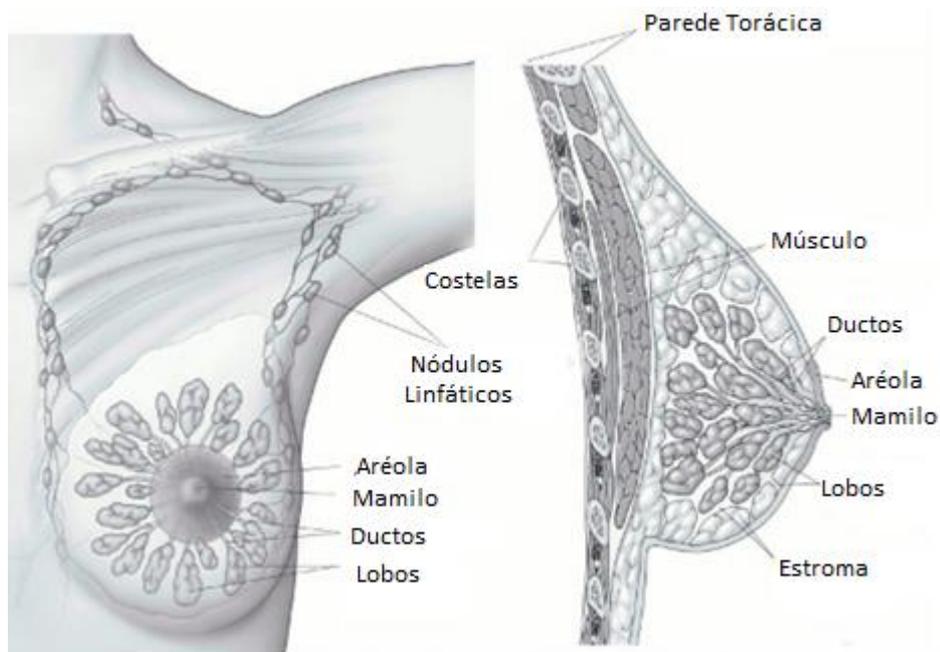
**Incorporating HER-2 / neu Epitope Elicits Protection That Prevents and Limits Tumor Growth and Spread of Breast Cancer in a Mouse Model.** *Journal of Immunology Research.*, (2017).

- SOUZA, M. J. D., GALA R. P., UBALE R. V., D'SOUZA B., VO T. P., PARENKY A. C., MULLA N. S., D'SA S., D'SOUZA M., BRAZ-GOMES K., D'SOUZA N., CHIRIVA-INTERNATI M., ZUGHAIER S. **Trends in Nonparenteral Delivery of Biologics, Vaccines and Cancer Therapies.** In: SINGH M., SALNIKOVA M. *Novel Approaches and Strategies for Biologics, Vaccines and Cancer Therapies.* San Diego: Elsevier Inc., 2015. ISBN: 978-0-12-416603-5. p. 89–122.
- SUH D. H., KIM M., KIM K., KIM H. J., LEE K., KIM J. **Major clinical research advances in gynecologic cancer in 2016: 10-year special edition.** *Journal of Gynecologic Oncology.*, 28 (2017), 1–25.
- TANAKA H., HAZAMA S., LIDA M., TSUNEDOMI R., TAKENOUCHE H., NAKAJIMA M., TOKUMITSU Y., KANEKIYO S., SHINDO Y., TOMOCHIKA S., TOKUHISA Y., SAKAMOTO K., SUZUKI N., TAKEDA S., YAMAMOTO S., YOSHINO S., UENO T., HAMAMOTO Y., FUJITA Y., TANAKA H., TAHARA H., TAHARA K., SHIMIZU R., OKUNO K., FUJITA K., KURODA M., NAKAMURA Y., NAGANO H. **miR-125b-1 and miR378a are predictive biomarkers for the efficacy of vaccine treatment against colorectal cancer.** *Cancer Science.* (2017)
- TORRE L. A., ISLAMI F., SIEGEL R. L., WARD E. M., JEMAL A. - **Global cancer in women: Burden and trends.** *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention.*, 26 (2017), 444-457.
- TURASHVILI G., BROGI, E. **Tumor Heterogeneity in Breast Cancer.** *Frontiers in Medicine.*, 4 (2017).
- World Health Organization. WHO cancer today population fact sheet. 2012. <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-populations?population=900&sex=2>. Acesso a 3 de Julho de 2018.
- YU L., TANG J., ZHANG C., ZENG W., YAN H., LI M., CHEN X. **New Immunotherapy Strategies in Breast Cancer.** *International Journal of Environmental Research and Public Health.*, 14 (2017).
- YUAN Y., KOS F. J., HE T., YIN H. H., LI M., HARDWICK N., ZURCHER K., SCHOMOIZE D., LEE P., PILLAI R. K., CHUNG V., DIAMOND D. J. **Complete regression of cutaneous metastases with systemic immune response in a patient with triple negative breast cancer receiving p53MVA vaccine with pembrolizumab.** *Oncolimmunology.*, 6 (2017).

## 8. ANEXOS



**FIGURA 1:** Taxa estimada de incidência, mortalidade e prevalência por 5 anos, de diferentes tipos de cancro, nas mulheres em todo o mundo, em 2012. (World Health Organization, 2012)



**FIGURA 2:** Anatomohistologia da mama feminina e respetivos constituintes mamários. (Esquema adaptado de <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets/populations?population=900&sex=2>)

**TABELA 1:** Resumo dos ensaios clínicos com vacinas para o cancro da mama, em 2017. Tabela adaptada de (Monnot e Romero, 2017).

Antigen	Type of Vaccine	Route	Combination	Clinical trial reference	Location/sponsor	Cancer type	Phase
CD105/Yb-1/SOX2/CDH3/MDM2	DNA	Intradermal	GM-CSF	NCT02157051	University of Washington	HER2 neg	I
Folate Receptor alpha	Peptide	Intradermal	GM-CSF and cyclophosphamide	NCT02593227	Tapimmune Inc.	TNBC	II
Her2	Dendritic cells	Intranodal or Intralesional	None	NCT02061332	University of Pennsylvania	DCIS	I/II
Her2	Dendritic cells	Intradermal	None	NCT01730118	National Institutes of Health Clinical Center	Her2+	I
Her2	Peptide	Intramuscular	Montanide + Nor-MDP	NCT01376505	Ohio State University Comprehensive Cancer Center	Metastatic	I
Her2	Peptide	Intradermal	trastuzumab	NCT00194714	University of Washington	Her2+	I/II
Her2	Peptide	Intradermal	trastuzumab and polysaccharide-K	NCT01922921	Fred Hutch/University of Washington Cancer Consortium	Her2+	I/II
Her2	Peptide	Intradermal	GM-CSF and trastuzumab	NCT01570036	Genentech, Inc. And Galena Biopharma Inc	Her2+	II
Her2	Peptide	Intradermal	GM-CSF	NCT02636582	National Cancer Institute (NCI)	DCIS	II
Her2	Peptide	Intradermal	GM-CSF and trastuzumab	NCT02297698	Genentech, Inc. And Galena Biopharma Inc	High risk Her2+	II
Her2	Peptide	NS	cyclophosphamide + GM-CSF	NCT02276300	Technische Universität München	Her2+	I
Her2	Viral plasmid	NS	None	NCT02751528	NantBioScience, Inc.	Her2 low	I
Mag-Tn3	Peptide	Intramuscular	AS15	NCT02364492	Institut Pasteur	Her2 neg	I
Mammaglobin-A	DNA	Intramuscular	Endocrine Therapy	NCT02204098	Washington University School of Medicine	Her2 neg and ER+	Ib
Muc-1	Viral plasmid	Subcutaneous	None	NCT02140996	Singapore Clinical Research Institute	recurrent or metastatic BC	I
Multi epitope folate receptor alpha	Peptide	Intradermal	cyclophosphamide + GM-CSF	NCT03012100	National Cancer Institute (NCI)	TNBC	II
Multiple	Whole cell	Intradermal	cyclophosphamide and interferon-alpha 2b	NCT03066947	BriaCell Therapeutics Corporation	recurrent or metastatic BC	I/IIa
Multiple	Whole cell expressing GM-CSF	Intradermal	trastuzumab + cyclophosphamide	NCT00971737	Johns Hopkins University/Sidney Kimmel Cancer Center	Her2 neg	II
Multiple TAA + neoantigens	RNA	NS	None	NCT02316457	Biontech AG	TNBC	I
p53	Virus	Subcutaneous	Pembrolizumab	NCT02432963	City of Hope Medical Center	TNBC	I
PVX-410	Peptide	Intramuscular	Durvalumab	NCT02826434	Massachusetts General Hospital	TNBC	I
Tumour associated carbohydrate antigens	Carbohydrate mimotope	NS	Chemotherapy + Montanide	NCT02938442	University of Arkansas	TNBC	II
Tumour blood vessel antigens	Dendritic cells	Intradermal	gemcitabine hydrochloride	NCT02479230	Case Comprehensive Cancer Center	all	I

**TABELA 2:** Ensaios clínicos a decorrer com vacinas à base de peptídeos, para o cancro da mama, em 2017. Tabela adaptada de (Li, X. e Bu, 2017).

Phase	Study	BC subtype	Trial ID	PI
I	Personalized synthetic long peptide vaccine +chemo	TNBC	NCT02427581	Gillanders
I/II	HER2 peptide vaccine + GM-CSF + chemo +adoptive HER2-specific T cells	HER2 + BC	NCT00791037	Disis
I	Ad-sig-hMUC-1/ecdCD40L vaccine	BC	NCT02140996	Toh
II	Folate receptor alpha + GM-CSF	TNBC	NCT02593227	Kenney
II	E75 + GM-CSF	DCIS	NCT02636582	Mittendorf
I	hTERT/survivin multi-peptide vaccine + Basiliximab (anti-CD25)	BC	NCT01660529	Fox
I	PVX-410 + PD-L1 inhibitor	TNBC	NCT02826434	Multiple PI
II	E75 + GM-CSF + Herceptin	HER2 low BC	NCT01570036	Peoples
I	HER2 peptide vaccine	BC	NCT01376505	Kaumaya
I/II	HER2 ICD peptide vaccine + trastuzumab	HER2 + BC	NCT01922921	Salaar
I	HER2 peptide + GM-CSF + chemo + imiquimod	HER2 + BC	NCT02276300	Krackhardt
II	E75 + GM-CSF + trastuzumab	HER2 + BC	NCT02297698	Peoples
I	Sialyl Lewis <sup>x</sup> -KLH + QS21	BC	NCT00470574	Gilewski + Dickler
I	MUC-1 peptide vaccine + PolyICLC	TNBC	NCT00986609	Baar
I/II	Folate-binding protein peptide vaccines (E39 and J65) + GM-CSF	BC	NCT02019524	Peoples
II	GP2Z + GM-CSF vs AE37 + GM-CSF vs GM-CSF	BC	NCT00524277	Peoples
I	HER2 ECD + TM protein vaccine	BC	NCT01526473	Lyerly

**TABELA 3:** Ensaios clínicos a decorrer com vacinas à base de células dendríticas, para o cancro da mama, em 2017. Tabela adaptada de (Li, X. e Bu, 2017).

Phase	Study	BC subtype	Trial ID	PI
I	Tumor blood vessel antigen peptide-pulsed DC	BC	NCT02479230	Baar
I	Ad HER2-pulsed DC	Her2/neu + BC	NCT01730118	Wood
III	DC + Chemo	TNBC	NCT02018458	Shaughnessy
I	HER2-pulsed DC	Her2/neu + BC	NCT02063724	Czerniecki
I	HER2-pulsed DC + Chemo	Her2/neu + BC	NCT02061423	Czerniecki
I/II	HER2-pulsed DC	DCIS	NCT02061332	Czerniecki