



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

José Eduardo Magalhães Ramos Torres

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Vacinas Terapêuticas Contra o Cancro” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Diva Maria Silva, Dra. Ana Rita Rodrigues e do Professor Doutor Alcino Jorge Leitão e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

José Eduardo Magalhães Ramos Torres

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Vacinas Terapêuticas Contra o Cancro” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Diva Maria Silva, Dra. Ana Rita Rodrigues e do Professor Doutor Alcino Jorge Leitão e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro 2020

Eu, José Eduardo Magalhães Ramos Torres, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2015241567, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo dos Documentos Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Vacinas Terapêuticas contra o Cancro” apresentadas à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no 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, 21 de outubro de 2020.

A handwritten signature in blue ink, reading "José Eduardo Magalhães Ramos Torres", is written over a horizontal line.

(José Eduardo Magalhães Ramos Torres)

Agradecimentos

Aos meus pais,

Por estabelecerem desde cedo os alicerces do meu percurso académico, pelo incondicional apoio nos melhores e piores momentos, pelos ensinamentos transmitidos e pelo esforço diário para proporcionarem as melhores condições para o meu desenvolvimento pessoal, em detrimento dos seus próprios obstáculos e dificuldades.

Ao meu irmão e irmã,

Pela constante entreaajuda ao longo dos anos, pelos sonhos, esperanças e objetivos que juntos alimentámos e nos trouxeram onde estamos hoje. Por caminharem ao meu lado na bonança e adversidade, agora e sempre.

À Sofia,

Por me acompanhares durante esta caminhada, pelo apoio nos dias mais longos e pelas memórias criadas nos dias que pareceram curtos demais. Pelas palavras de conforto e motivação, pelo teu sacrifício em prol do meu bem-estar.

Ao Pedro e ao Tiago,

Por acreditarem em mim, por me ensinarem a sentir Coimbra de um modo singular e por tornarem a vida universitária, uma experiência marcante e especial para mim.

Ao Professor Doutor Alcino Leitão,

Por me ter introduzido a um interessante tema de monografia, que expandiu os meus conhecimentos e pela acessibilidade na resposta às minhas dúvidas e questões.

Aos colaboradores da Bluepharma,

Pela integração, pelos ensinamentos e valores transmitidos, que me elucidaram acerca da realidade da indústria farmacêutica e que contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À equipa da Farmácia Santa Isabel,

Pela transmissão dos valores de farmácia comunitária através da demonstração da vertente humana da profissão farmacêutica. Pela afável integração na sua equipa, pela paciência e compreensão das dúvidas e dificuldades. Pelos ensinamentos e valores transmitidos, de cuidado com a saúde e bem-estar físico e mental do utente.

Muito Obrigado!

Science does not know its debt to imagination.

Ralph Waldo Emerson

Índice

Parte I – Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Lista de Abreviaturas	8
1. Introdução	9
2. Bluepharma.....	10
3. Análise SWOT	10
3.1. Pontos Fortes (<i>Strengths</i>)	11
3.2. Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>)	14
3.3. Oportunidades (<i>Opportunities</i>)	14
3.4. Ameaças (<i>Threats</i>).....	16
4. Considerações Finais.....	19
5. Bibliografia.....	20

Parte II – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	22
1. Introdução	23
2. Análise SWOT	24
2.1. Pontos Fortes (<i>Strengths</i>)	24
2.2. Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>)	27
2.3. Oportunidades (<i>Opportunities</i>)	28
2.4. Ameaças (<i>Threats</i>).....	29
3. Casos Práticos	30
4. Considerações Finais.....	31
5. Bibliografia	32

Parte III – Monografia “Vacinas Terapêuticas contra o Cancro”

Lista de Abreviaturas	34
Resumo	37
Abstract	38
1. Introdução.....	39
2. Ambiente tumoral.....	40
2.1. Células endoteliais e Angiogénese Tumoral.....	40
2.2. Inflamação e Células do Sistema Imunitário	42
2.3. Imunovigilância e Imunoedição	43
3. Tipos de vacinas antitumorais	44
3.1. Vacina de célula tumoral inteira (<i>Whole tumoral cell vaccine</i>)	44
3.1.1. Vacinas baseadas em exossomas tumorais	46

3.1.2. Vacina baseada em lisado de célula tumoral necrótica.....	46
3.1.3. Vacinas baseadas em células tumorais apoptóticas.....	47
3.1.4. Aplicações	48
3.2. Vacinas com base em peptídeos (<i>Peptide vaccines</i>).....	50
3.2.1. Vacinas com peptídeos curtos e peptídeos longos.....	50
3.2.2. Vacinas de epítipo único e multipeptídicas.....	51
3.2.3. Aplicações	52
3.3. Vacinas com base em células dendríticas (<i>Dendritic Cell Cancer Vaccines</i>)	54
3.3.1. Pulsação de vacinas baseadas em DCs	55
3.3.2. Processos de maturação de DCs.....	57
3.3.3. Aplicações	57
3.4. Vacinas de DNA e RNA (<i>DNA and RNA Vaccines</i>)	59
3.4.1. Respostas imunes desejáveis e indesejáveis.....	60
3.4.2. Segurança.....	61
3.4.3. Vetores biológicos e não biológicos	62
3.4.4. Aplicações	63
4. Estratégias alternativas e terapêuticas adjuvantes a vacinação tumoral.....	64
4.1. Vacinação com células cancerígenas estaminais.....	64
4.2. Vacinação com neoantígenos.....	65
4.3. Outras terapias antitumorais	66
5. Perspetivas Futuras	68
6. Bibliografia.....	70

Parte I

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Bluepharma S.A.

Lista de Abreviaturas

API – Princípio ativo

ARA – Antagonista dos Recetores da Angiotensina

CHMP – *Committee for Medicinal Products for Human Use*

COVID-19 – Doença provocada pelo SARSCoV-2

EMA – Agência Europeia do Medicamento

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

HT – *Holding Times*

BPF – Boas Práticas de Fabrico

MAH – *Marketing Authorisation Holder*

MBR – *Manufacturing Batch Record*

NDMA – N-Nitrosodimetilamina

OoS – *Out of Specification*

PBR – *Product Batch Record*

PQR – *Product Quality Review*

SOP – *Standard Operating Procedures*

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

UC – Universidade de Coimbra

I. Introdução

O estágio curricular surge como um componente obrigatório do plano curricular de todos os estudantes matriculados no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Com uma duração de seis meses, é dada ao estudante a oportunidade de escolher estagiar somente em Farmácia Comunitária, ou dividir o seu tempo de estágio e optar por estagiar também noutra vertente da área farmacêutica. Tendo optado por realizar o estágio em dois locais diferentes, candidatei-me a um estágio em indústria farmacêutica, na Bluepharma Indústria, S.A., tendo sido aceite. Iniciei o referido estágio no dia 6 de janeiro e terminei no dia 30 de abril do presente ano de 2020.

Este relatório diz respeito ao estágio realizado na Bluepharma Indústria S.A., com sede em S. Martinho do Bispo, em que integrei, na qualidade de estagiário, o Departamento de Garantia de Qualidade, sob a orientação da Dra. Diva Silva. Neste Departamento fiquei encarregue de providenciar apoio à equipa de Gestão de Fornecedores, nomeadamente no campo dos Fornecedores de Serviços e Materiais Subsidiários. Numa segunda instância, dei apoio à equipa encarregue de fazer as avaliações de risco relativamente à presença de nitrosaminas. Tive também oportunidade de conhecer o trabalho desenvolvido pelos restantes membros da Garantia da Qualidade, o que tornou a minha experiência ainda mais enriquecedora.

O presente relatório é escrito segundo as Normas Orientadoras da Unidade Curricular “Estágio” do ano letivo 2019/2020, apresentando-se sob a forma de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), que me permite avaliar de um modo sistemático o contributo deste estágio para o meu desenvolvimento pessoal e profissional, como elemento complementar da aprendizagem durante o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

2. Bluepharma

A Bluepharma, fundada em fevereiro de 2001 após aquisição de uma unidade industrial da farmacêutica Bayer, é uma empresa que se divide em três principais áreas: a produção de medicamentos genéricos para a Bluepharma e para outras empresas em todo o mundo; a pesquisa, desenvolvimento e registo de fármacos e ainda a promoção dos seus produtos.

A Bluepharma tem a sua sede industrial e administrativa em S. Martinho do Bispo, na qual realizei o meu estágio. O Departamento da Garantia de Qualidade dedica-se a uma miríade de funções, que apoiam todo o ciclo do medicamento, desde o desenvolvimento, produção, análise distribuição e saída do mercado. Assim, o trabalho desenvolvido abrange, entre outros a preparação de documentação de suporte à produção (protocolos e relatórios de validação de processos), a execução de avaliações periódicas de produto/processo (por exemplo através dos *Product quality review* (PQR)), a análise e seguimento de parâmetros de qualidade (desvios, alterações, ações corretivas e preventivas), a gestão de reclamações, de resultados fora de especificação ou *out of specification* (OoS) e de tempos de espera ou *holding times* (HT), a qualificação e avaliação de fornecedores, a revisão da documentação de fabrico e embalagem, a supervisão da fabricação e a libertação de produto.

O meu estágio incidiu no apoio à equipa de Gestão de Fornecedores, que é essencialmente responsável pela compilação da documentação de qualidade dos diferentes fabricantes e/ou fornecedores, assim como a sua qualificação e posterior avaliação, como um modo de garantir que as matérias-primas, os materiais e os serviços adjudicados obedecem a padrões de qualidade definidos pelas BPF e pelos padrões de referência de qualidade aplicáveis. Todo o suporte de resposta a pedidos relacionados com fabricantes/fornecedores, é dado por esta equipa que atua como elo entre a Bluepharma e entidades exteriores à empresa.

3. Análise SWOT

A análise SWOT efetuada neste relatório pretende avaliar o estágio efetuado na Bluepharma, procedendo a uma avaliação interna e externa. Na avaliação interna são descritos os pontos fortes (*Strengths*) e os pontos fracos (*Weaknesses*) do estágio e a nível externo são aqui descritas potenciais oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*).

<p>Pontos Fortes (<i>Strengths</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ Programa de integração. ◆ Formação interna. ◆ Gestão de fornecedores. ◆ Equipa Técnica - Garantia de Qualidade. ◆ Competências profissionais adquiridas durante o estágio. 	<p>Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ Reestruturação da empresa. ◆ Data das formações internas.
<p>Oportunidades (<i>Opportunities</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ Auditorias à Bluepharma. ◆ Pandemia global por COVID-19. ◆ Requisição de avaliação de Nitrosaminas pela EMA. 	<p>Ameaças (<i>Threats</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ Tempo de resposta de fornecedores. ◆ Constrangimento de prazo na avaliação de nitrosaminas. ◆ Plano Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

3.1. Pontos Fortes (*Strengths*)

3.1.1 Programa de integração

À entrada de um novo colaborador na Bluepharma, ainda que no âmbito de um estágio curricular, existe um plano de integração em que o Departamento de Recursos Humanos organiza uma sessão de boas-vindas, à qual se segue uma breve apresentação dos novos elementos aos colaboradores dos diferentes departamentos da empresa e vice-versa. Esta prática permite uma familiarização com os colaboradores que já se encontram na empresa. Adicionalmente, a cada estagiário curricular é atribuído um colaborador que desempenha o papel de tutor, auxiliando o estagiário nas tarefas em que este apresenta dificuldades e oferecendo indicações relativamente às funções a desempenhar.

Este programa permite aos novos colaboradores uma integração rápida e uma desinibição na exposição dos seus problemas e questões, que contribui para uma maior eficiência e para um ambiente saudável no local de trabalho. Assim, existem grandes benefícios em termos das relações interpessoais desenvolvidas e do rendimento do trabalho realizado.

3.1.2. Formação interna

A Bluepharma promove, como parte do seu plano de integração, um conjunto de formações internas, que permitem o aumento do conhecimento dos seus colaboradores em diferentes áreas da indústria farmacêutica, dando a conhecer as práticas da empresa e os procedimentos adequados adotar no exercício das nossas funções.

Como resultado, nos primeiros dias de estágio, é necessária a leitura de algumas Normas Operativas Padrão ou *Standard Operating Procedures (SOPs)*, adequadas às funções a desempenhar. Ao meu caso foram aplicáveis SOPs de gestão documental, gestão de fornecedores e ainda auditorias. Num âmbito geral, foram ministradas formações como, por exemplo, Ambiente e Segurança, Assuntos Regulamentares, Sistema de Gestão Integrado, entre outras.

Para além das formações em sala, tive a possibilidade de visitar o Departamento de Controlo de Qualidade e seguir alguns colaboradores, o que me permitiu alargar a compreensão do trabalho aqui realizado. Foram também realizadas visitas ao Armazém, em que foi possível compreender de que forma as matérias-primas, produto semiacabado e acabado são identificados em ambiente industrial e de que forma é avaliado o seu estado de conservação.

Adicionalmente, foi-me concedida a oportunidade de participar numa auditoria interna ao Armazém, em S. Martinho do Bispo e em Taveiro, o que me permitiu testemunhar de que forma se desenrola este processo e ainda compreender a partir de uma nova perspetiva, de que forma funciona este departamento da indústria.

3.1.3. Gestão de fornecedores

O trabalho que desenvolvi no âmbito da Gestão de Fornecedores foi enriquecedor na medida em que me permitiu aplicar conhecimentos de Garantia e Gestão de Qualidade em prol de uma melhoria no registo documental de fornecedores da Bluepharma. No trabalho que desenvolvi apliquei ainda conhecimentos de Assuntos Regulamentares do Medicamento e de Tecnologia Farmacêutica.

Assim, encarreguei-me de providenciar apoio à equipa de Gestão de Fornecedores no âmbito dos fornecedores de serviços e materiais subsidiários. O meu trabalho consistiu na caracterização dos fornecedores de serviços e materiais subsidiários, juntamente com a sua avaliação, um procedimento anual que deve ser realizado, preferencialmente, no primeiro

trimestre do ano. A tarefa de caracterização dos fornecedores de serviços e materiais subsidiários envolve o contacto constante com estes fornecedores e também com os diferentes departamentos internos, que serão responsáveis pela adjudicação destes fornecedores e, por consequência, pela sua comunicação ao departamento de Garantia de Qualidade onde é efetuada triagem e compilação dos fornecedores adjudicados no ano transato e é efetuada uma avaliação destes consoante as informações disponibilizadas.

Adicionalmente, integrei também a equipa de avaliação de risco das nitrosaminas, em que participei na avaliação de declarações, questionários e informações de fabricantes e fornecedores de matérias-primas como excipientes, princípios ativos (API) e materiais de embalagem.

3.1.4. Equipa Técnica - Garantia de Qualidade

Outro dos pontos fortes do meu estágio curricular foi a oportunidade de colaborar com a equipa do departamento da Garantia de Qualidade, uma equipa de grande valia, competência e qualificação, com formação académica e profissional que assenta maioritariamente no ramo farmacêutico, químico e engenharia. Esta equipa sempre me auxiliou no esclarecimento de dúvidas e questões relacionadas com o trabalho que desempenhei e também relacionadas com diversos aspetos da vida profissional.

Para além do grupo responsável pela Gestão de Fornecedores, que atualmente conta com quatro colaboradores, existem ainda o grupo de apoio ao Desenvolvimento Analítico e Galénico, o grupo da Rotina ou Fabricação, o grupo de Gestão de Auditorias e ainda o grupo de Gestão Documental.

3.1.5. Competências profissionais adquiridas durante o estágio

Um dos principais pontos fortes que o estágio curricular na Bluepharma me providenciou foi a oportunidade de adquirir um conjunto de competências profissionais, que contribuíram para o meu desenvolvimento. Competências relacionadas com comunicação com entidades externas em português e inglês, comportamento em contexto de trabalho, relacionamento com colegas de trabalho, trabalho em equipa e compreensão da importância do trabalho desempenhado pelos diferentes departamentos internos e de que forma estes se interligam. Revalidei ainda o meu entendimento relativamente a valores como

responsabilidade, empenho e dedicação necessários ao bom desempenho profissional em contexto industrial, nomeadamente na área da Garantia da Qualidade.

3.2. Pontos Fracos (*Weaknesses*)

3.2.1 Reestruturação da empresa

Embora a experiência de estágio na Bluepharma tenha sido muito positiva, devo salientar que a data da minha chegada coincidiu com uma reestruturação interna na empresa, no que concerne ao seu organigrama global. Apesar de as alterações de natureza logística terem ocorrido maioritariamente na minha primeira semana de estágio, estas foram-se prolongando, em menores proporções, ao longo do primeiro e segundo mês de estágio, o que provocou um aumento da necessidade de entreaajuda entre colaboradores, na contextualização das novas tarefas atribuídas e na execução das novas funções em situações pontuais.

Por esta razão, devido à mudança de locais de trabalho em alguns casos, houve inicialmente alguma dificuldade na organização do espaço de trabalho, uma situação que foi rapidamente ultrapassada pela prontidão com que a equipa se apresentou disponível para ajudar.

3.2.2. Data das formações internas

A existência de formações internas, apesar de benéfica para a nossa instrução em práticas corretas e ainda no âmbito do desenvolvimento do colaborador em áreas aplicadas exclusivamente à indústria farmacêutica, nem sempre surgiu na melhor ocasião, coincidindo com reuniões ou tarefas urgentes. Assim, a uniformização de horário para administração das formações seria uma mais-valia para que não houvesse sobreposição entre o trabalho e as formações.

3.3. Oportunidades (*Opportunities*)

3.3.1. Auditorias à Bluepharma

Enquanto indústria farmacêutica, a Bluepharma tem diversos clientes que se situam um pouco por todo o mundo e, periodicamente, realizam auditorias à Bluepharma como forma de aferir se os procedimentos de fabrico e qualidade aplicados cumprem as BPF e melhor conhecer de que forma funciona a indústria que subcontrataram.

No decorrer do período de estágio curricular, tive a oportunidade de assistir a várias auditorias de clientes, representadas por serviços subcontratados ou por uma Equipa Auditora da própria empresa. Fiz também parte das reuniões de preparação e balanço das mesmas. Esta foi uma prática que me permitiu compreender que os requisitos de qualidade e as BPF são requisitos essenciais e transversais a nível mundial.

3.3.2. Pandemia global por COVID-19

Durante o mês de março de 2020, o último mês do meu estágio na Bluepharma, foi decretado o Estado de Emergência pelo Estado Português, o que conduziu ao fecho de grande parte dos estabelecimentos comerciais e confinou uma grande percentagem da população ativa às suas próprias residências, como forma de impedir o contágio da nova estirpe de coronavírus, COVID-19. No âmbito do Plano de Contingência definido pela Bluepharma, os estagiários curriculares juntamente com grande parte dos colaboradores passaram a trabalhar a partir de casa, num regime de teletrabalho.

Assim, este acontecimento de grande impacto para a saúde pública portuguesa e mundial, que em muitos casos amedrontou a população, não reduziu a vontade de trabalhar dos colaboradores da Bluepharma e traduziu-se, no que me diz respeito, numa oportunidade de contactar com novas tecnologias, como é o caso do *software Microsoft Teams*, utilizado para reuniões diárias e chamadas durante o período de trabalho, permitindo-me trabalhar apesar da adversidade.

Esta oportunidade ajudou-me a compreender a dedicação da Bluepharma ao cumprimento da sua missão: a produção e distribuição de medicamentos aos que, para além do vírus pandémico, têm que lidar com outros problemas de saúde e que necessitam de medicação para continuar as suas vidas com a maior normalidade possível.

3.3.3. Requisição de avaliação de Nitrosaminas pela EMA

Em 2018, foi detetada a presença de impurezas em lotes de antagonistas dos recetores da angiotensina (ARA), conhecidos como *sartans*. Estas impurezas, entre as quais se incluíam o N-Nitrosodimetilamina (NDMA), pertencem ao grupo químico das nitrosaminas e têm propriedades carcinogénicas quando consumidas durante longos períodos. Esta agravante desencadeou um conjunto de medidas regulamentares que visavam aumentar os requerimentos para o fabrico de *sartans*, com o objetivo de reduzir ao máximo a possibilidade

de contaminação da medicação. Recentemente, estas mesmas impurezas foram detetadas em lotes de ranitidina e a *Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)* tomou a decisão de que todos os Titulares da Autorização de Introdução no Mercado deveriam iniciar uma avaliação global da possibilidade de contaminação com nitrosaminas dos medicamentos com princípios ativos quimicamente sintetizados, produzidos por todas as indústrias que se encontram sob jurisdição da *European Medicines Agency (EMA)*.

A avaliação quanto à presença de impurezas divide-se em três fases. Numa primeira fase, que envolve a avaliação de risco, os *Marketing Authorisation Holders (MAH)* devem efetuar a avaliação dos medicamentos que contêm produtos quimicamente sintetizados, de acordo com princípios de Gestão de Qualidade. Esta avaliação deverá ser efetuada em conjunto com os fabricantes de API e de produto acabado, se aplicável. Na eventualidade de existirem produtos que apresentam risco de presença de nitrosaminas, deverão proceder-se a testes confirmatórios, que constituem o segundo passo desta avaliação. Estes testes realizam-se de acordo com métodos sensíveis e devidamente validados, de acordo com a ordem de prioridade estabelecida na primeira fase. Na terceira fase, o MAH deverá requerer uma alteração da autorização de introdução do medicamento no mercado, de forma a corrigir os passos do processo de manufatura ou especificações do produto passíveis de gerar estas impurezas.

Para a primeira fase e a Bluepharma preparou análises de risco com base na análise de informação enviada pelos fornecedores de API, materiais de embalagem e excipientes, bem como o processo de fabrico utilizado para produção do produto final e, da análise do produto em estabilidade. Este foi um trabalho que muito me realizou a nível profissional, pois permitiu-me compreender verdadeiramente as dinâmicas de trabalho em equipa e a organização de diferentes departamentos para o cumprimento de um objetivo comum, já que o prazo estimado inicialmente pela EMA para a execução da primeira fase era 26 de março 2020.

3.4. Ameaças (*Threats*)

3.4.1. Tempo de resposta de fornecedores

No âmbito do trabalho que desenvolvi na Avaliação de Fornecedores de Serviços e Materiais Subsidiários da Bluepharma considero como ameaça o tempo elevado de resposta destes fornecedores, que provocava um atraso no arquivamento e compilação da informação necessária para estabelecer uma base de dados fiável. Tendo em conta que o estágio que realizei teve um prazo bastante limitado, foi frequentemente necessário encetar múltiplas

tentativas de contacto com estes fornecedores, não só para a entrega da documentação aplicável ao serviço que providenciavam, como também para efetuar as correções às informações enviadas.

3.4.2. Constrangimento de prazo na avaliação de nitrosaminas

Apesar de o trabalho na avaliação do risco relativamente à presença de nitrosaminas me tenha realizado do ponto de vista profissional, devo reconhecer que o prazo de 26 de março de 2020, definido pela EMA para a entrega das mesmas poderá não ter sido o ideal, tendo em conta o cenário global de pandemia que acometeu todos os países do continente europeu.

Posteriormente, a EMA tomou a decisão de adiar a entrega das avaliações de risco dos diferentes produtos para 1 de outubro de 2020, contudo, uma vez que esta alteração surgiu no próprio dia 26 de março, a equipa encarregue de efetuar as avaliações trabalhou exaustivamente para cumprir o prazo inicialmente delineado. Para além disto, a pandemia global da doença COVID-19 condicionou a resposta de alguns fornecedores, nomeadamente em Itália, o que dificultou a elaboração das avaliações.

Pessoalmente, os constrangimentos no prazo de entrega das avaliações de risco condicionaram-me não só devido às horas extraordinárias necessárias para o cumprir, mas essencialmente devido à necessidade constante que os meus colegas tinham do trabalho que eu desenvolvia, devido ao curto prazo para entrega, o que me obrigava a trabalhar com grande rapidez.

Em retrospectiva, considerando a situação de saúde pública excepcional que se atravessava, penso que teria sido uma mais-valia o adiamento preventivo do prazo como forma de possibilitar a realização de avaliações de risco menos conservadoras, embora reconheça que este mesmo constrangimento tenha contribuído para o desenvolvimento de competências como trabalho em equipa, comunicação e trabalho sob pressão.

3.4.3. Plano Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Como referi anteriormente, a oportunidade que nos é conferida pela FFUC de estagiar em indústria farmacêutica, ao contrário do que acontece em outras instituições de ensino, é uma grande vantagem para os estudantes que procuram ingressar nesta área da profissão farmacêutica. Contudo, o Plano Curricular administrado durante o Mestrado Integrado em

Ciências Farmacêuticas tem algumas lacunas para os estudantes que desejam trabalhar no ramo industrial. Estas lacunas encontram-se maioritariamente na área da Qualidade e na forma como as normas BPF se interligam com a Química Farmacêutica e a Tecnologia Farmacêutica. O desenvolvimento do conhecimento nestas áreas revelar-se-ia de extrema utilidade para os estudantes que escolhem enveredar pela indústria como opção profissional.

Embora durante o período de estágio tenha efetivamente reconhecido a existência de algumas lacunas no meu conhecimento devo salientar que os colaboradores do departamento da Garantia da Qualidade sempre me prestaram auxílio no esclarecimento de dúvidas que surgiram. Contudo, reconheço que o Plano Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas é bastante vasto e diversificado, considerando a variedade de áreas de trabalho disponíveis para o farmacêutico contemporâneo.

4. Considerações Finais

O estágio curricular que realizei em indústria farmacêutica, na área da Garantia da Qualidade, constituiu uma oportunidade de vivenciar o dia-a-dia numa empresa farmacêutica com colaboradores dedicados e trabalhadores, com capacidade de ultrapassar a adversidade em equipa, ajudando o próximo com a certeza de que apenas juntos progredirão e desempenharão as suas funções de forma eficaz, competente e correta. Foi um período de aprendizagem em que cresci do ponto de vista profissional, científico e pessoal e em que em mim descobri uma capacidade de adaptação, trabalho e dedicação que desconhecia em contexto de trabalho. Por estas razões, termino o período de estágio satisfeito com a minha prestação, ciente de que tudo fiz para contribuir da melhor forma para a progressão da empresa e facilitar o trabalho dos restantes colaboradores que comigo trabalharam.

Gostaria de deixar uma palavra de enorme agradecimento a todos os colaboradores do Departamento da Garantia de Qualidade, que desde o primeiro dia me ajudaram no desempenho das funções que me foram atribuídas e me permitiram compreender melhor a realidade industrial e do mundo do trabalho. Um agradecimento especial à equipa de Gestão de Fornecedores, que me delegaram responsabilidades, que me permitiram compreender melhor a área da Qualidade e que me instruíram nos meandros do trabalho que desenvolvem.

Findo o período de estágio na Bluepharma, o balanço que faço é muito positivo. Por ser uma indústria que aposta na produção de medicamentos com elevados requisitos de qualidade e também na investigação e desenvolvimento de medicamentos, tendo em vista a inovação no setor industrial farmacêutico, posso concluir que a Bluepharma se revelou como o ponto de partida ideal para a minha vida profissional.

5. Bibliografia

BLUEPHARMA - Bluepharma. [Acedido a 23 de março de 2020]; Disponível em <https://www.bluepharma.pt/about-bluepharmagroup.php>

BLUEPHARMA - História [Acedido a 23 de março de 2020]; Disponível em <https://www.bluepharma.pt/about-history.php>

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - *Nitrosamine Impurities* [Acedido a 16 de abril de 2020]; Disponível em <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/post-authorisation/referral-procedures/nitrosamine-impurities>

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - *Information on Nitrosamines for Marketing Authorisation Holders (2019)* [Acedido a 26 de março de 2020]; Disponível em https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-information-nitrosamines-marketing-authorisation-holders_en.pdf

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - *Update on Nitrosamines in EU Medicines* [Acedido a 26 de março de 2020]; Disponível em <https://www.ema.europa.eu/en/news/update-nitrosamines-eu-medicines>

Parte II

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Santa Isabel

Lista de Abreviaturas

COVID - 19 – Doença provocada pelo SARSCoV-2

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

PVP – Preço de Venda ao Público

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

I. Introdução

No âmbito do plano curricular do 5º ano do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) insere-se o estágio curricular em farmácia comunitária, que corresponde a um total de 670 horas de formação numa das áreas centrais do ramo farmacêutico. Assim, iniciei o meu estágio no dia 1 junho, terminando no dia 26 de setembro de 2020.

A farmácia que escolhi para a realização do estágio curricular foi a Farmácia Santa Isabel, localizada na Avenida Sá da Bandeira, em Coimbra, que é reconhecida e referenciada pela sua componente veterinária e pela simpatia e competência do seu pessoal farmacêutico.

Após o término de um estágio curricular em indústria farmacêutica, o ingresso num estágio em farmácia comunitária trouxe desafios físicos e mentais, que motivaram uma mudança na forma de pensar e estimularam a minha capacidade de resolução de problemas, sentido de responsabilidade e atenção ao detalhe.

O estágio em farmácia comunitária permitiu-me também aplicar conhecimentos adquiridos ao longo dos anos de estudo na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e, em simultâneo, compreender as repercussões da atividade farmacêutica na manutenção da saúde e bem-estar do cidadão comum. Para além da aplicação de conhecimento teórico, o tempo de estágio contribuiu também para o meu desenvolvimento pessoal e profissional, através da prestação de serviços farmacêuticos e atendimento às necessidades do utente.

O presente relatório procura examinar a minha experiência em farmácia comunitária através de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), que tem como objetivo salientar pontos fortes (*Strengths*), pontos fracos (*Weaknesses*), oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*), que se apresentaram benéficos ou prejudiciais para a minha aprendizagem durante o período de estágio.

2. Análise SWOT

A análise SWOT que se realiza neste relatório pretende avaliar e sumarizar o estágio curricular efetuado na Farmácia Santa Isabel, procedendo a uma avaliação interna e externa. Na avaliação interna são descritos os pontos fortes (*Strengths*) e os pontos fracos (*Weaknesses*), enquanto a nível externo são identificadas oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*).

Pontos Fortes (<i>Strengths</i>) <ul style="list-style-type: none">◆ Plano de estágio.◆ Equipa profissional e competente.◆ Localização da farmácia.◆ Especialização em farmácia veterinária.◆ Preparação de manipulados.	Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>) <ul style="list-style-type: none">◆ Duração do estágio.◆ Rutura de <i>stock</i> de medicamentos.
Oportunidades (<i>Opportunities</i>) <ul style="list-style-type: none">◆ Formação contínua.◆ Associação com uma instituição.	Ameaças (<i>Threats</i>) <ul style="list-style-type: none">◆ Pandemia de COVID-19.◆ Desconfiança do utente.

2.1. Pontos Fortes (*Strengths*)

2.1.1 Plano de estágio

O estágio em farmácia comunitária que tive a oportunidade de experienciar na Farmácia Santa Isabel foi planificado para que existisse uma interiorização gradual de conceitos farmacológicos e das diferentes funções do farmacêutico.

Assim, iniciei o meu estágio pela familiarização com o *software* Sifarma 2000® e localização de medicamentos na farmácia. Procedi ainda à receção de encomendas, que envolve a comparação do conteúdo da fatura de diferentes fornecedores com o que efetivamente chega à farmácia, juntamente com verificação de preços de custo, bonificações, datas de validade e alterações de preço de venda ao público (PVP), que poderão potencialmente ocorrer. Durante a receção de encomendas procedia ainda à verificação de *stocks* dos medicamentos presentes na farmácia, de acordo com o que se encontrava expresso na base de dados do Sifarma 2000®.

Para além de receção de encomendas, inteirei-me também da organização documental da farmácia, através do arquivo de faturas, notas de encomenda, notas de crédito, guias de

devolução e declarações de consentimento. Compreendi neste período que a organização documental é essencial para o correto funcionamento de uma farmácia comunitária. Adicionalmente, procurei recordar conhecimentos de farmacologia e indicação farmacêutica, através do estudo de fluxogramas e guias de aconselhamento presentes na farmácia.

Após o término do primeiro mês de estágio, iniciei a prática de serviços farmacêuticos através da medição de parâmetros bioquímicos, como a glicémia, colesterolémia e tensão arterial, acompanhados do respetiva avaliação e aconselhamento farmacêutico. Em simultâneo, assisti a práticas de aconselhamento farmacêutico e manuseamento de diferentes tipos de receitas médicas durante o atendimento, o que me permitiu a familiarização com o módulo de atendimento do *software* Sifarma 2000® e com os diferentes planos de participação.

Posteriormente, foi-me concedida a oportunidade de prestar serviços de atendimento ao público acompanhado por um farmacêutico, que corrigia os erros que cometia e colmatava as falhas iniciais no manuseamento do Sifarma 2000®. Com o decorrer do período de estágio o auxílio necessário para a prestação de um bom atendimento revelou-se cada vez menor, embora existissem com frequência conselhos por parte dos farmacêuticos presentes, de grande valia para a melhoria do aconselhamento farmacêutico que prestava.

2.1.2 Equipa profissional e competente

Durante o estágio curricular tive a oportunidade de aprender com uma equipa constituída pela diretora técnica, duas farmacêuticas e um técnico de farmácia, experimentados nas diferentes vertentes do aconselhamento farmacêutico e de grande competência e dedicação à qualidade do serviço prestado pela Farmácia Santa Isabel e ao bem-estar dos seus clientes, procurando a cada dia superar-se e dinamizar a farmácia.

A diretora técnica, juntamente com os restantes colaboradores da farmácia, em momento algum deixaram de responder às minhas questões ou ajudar em tarefas em que demonstrava maior dificuldade, demonstrando desde o início do meu período de estágio, uma atitude pedagógica e integradora, que me fez sentir parte daquela equipa que todos os dias trabalha para providenciar o melhor atendimento para os utentes que se dirigem à Farmácia Santa Isabel.

2.1.3. Localização da Farmácia

A Farmácia Santa Isabel, localiza-se na Avenida Sá da Bandeira, em Coimbra, que separa a Praça da República do Mercado D. Pedro V, com proximidade relativa ao Jardim da Manga e à zona baixa da cidade e Rua da Sofia. Assim, nesta avenida a miríade de locais de restauração e de comércio apresenta-se convidativa à visita de turistas e estudantes da Universidade de Coimbra, sendo ainda local de residência de um número considerável de conimbricenses, alguns dos quais utentes regulares da Farmácia Santa Isabel.

Deste modo, a localização estratégica da farmácia permitia que a prestação de cuidados farmacêuticos fosse variada, no que respeita às necessidades do utente, aconselhamento farmacêutico e ainda no idioma verbalizado durante a prestação destes serviços, o que contribuiu para uma aprendizagem enriquecedora e multifacetada dos meandros da farmácia comunitária.

2.1.4 Especialização em farmácia veterinária

Apesar de o conjunto de medicamentos e produtos de venda livre existentes na farmácia Santa Isabel ser amplo e variado, esta farmácia de oficina é conhecida pela procura de produtos na área da veterinária. Assim, muitos utentes dirigem-se a esta farmácia para adquirir a sua medicação ou produtos de venda livre que não encontrariam noutra local, obtendo também aconselhamento sobre práticas profiláticas, como a desparasitação interna e externa ou vacinação, e de combate a patologias menores como dermatites, problemas oculares ou respiratórios, de animais de estimação, como cães, gatos, hámsteres ou coelhos, ainda gado ovino, caprino ou bovino e de diferentes espécies de aves, como galinhas, canários ou pombos.

A especialização e procura de aconselhamento na área da veterinária contribuíram para o aprofundamento dos meus conhecimentos em temas como ciclos de desparasitação, controlo de natalidade de diferentes espécies animais e aconselhamento no âmbito de patologias diversas de índole respiratória, digestiva ou mesmo circulatória.

2.1.5 Preparação de manipulados

Um ponto forte da farmácia Santa Isabel é a preparação de uma ampla variedade de manipulados, desde pomadas ou cremes até soluções auriculares ou soluções cutâneas com diferentes fins.

Assim, a observação desta prática de forma recorrente permitiu-me, num ponto mais avançado do meu estágio, preparar alguns manipulados, sob supervisão de um dos farmacêuticos da farmácia. Permitiu-me ainda uma maior familiarização com as tabelas de cálculo do custo do próprio manipulado, com base no preço de custo dos diferentes princípios ativos e excipientes utilizados e de acordo com a forma farmacêutica preparada. [1]

2.2. Pontos Fracos (Weaknesses)

2.2.1 Duração do estágio curricular

Um dos pontos negativos do estágio curricular é, no meu ponto de vista, a sua curta duração para a aprendizagem de uma profissão, que apesar de requerer conhecimento teórico na área da farmacologia e indicação farmacêutica, necessita também de experiência para o seu desempenho de forma efetiva.

A experiência no atendimento ao público é necessária para o manuseamento rápido e ágil do *software* Sifarma 2000[®], conhecimento completo de diferentes planos de comparticipação e, acima de tudo, compreensão das necessidades de cada utente de forma individual, nomeadamente utentes regulares, que não só adquirem os seus medicamentos na farmácia como procuram também uma palavra amiga ou de conforto.

Um período de estágio superior seria também benéfico para o aprofundamento e conhecimentos de *back-office*, como uma maior compreensão da organização do receituário no final de cada mês e mesmo princípios mais avançados de gestão do *stock* da farmácia.

2.2.2 Rutura do stock de medicamentos

Durante o período de estágio foi possível assistir ao esgotamento de alguns medicamentos como Victan[®] e rateamento de muitos outros por parte de diferentes distribuidores, como Victoza[®], Mixtard Penfill[®], Prevenar 13[®], Eliquis[®] ou Broncho-Vaxom[®], o que impediu ou limitou a sua dispensa por parte de diferentes farmácias de oficina.

A ausência destes medicamentos, não só na Farmácia Santa Isabel, como também em muitas outras farmácias, demonstrou ser um grande inconveniente no dia-a-dia de muitos utentes que recorrem a alguns destes medicamentos de forma crónica, e que em alguns casos tiveram de se deslocar a instituições de saúde pública em busca de moléculas alternativas, que pudessem suprir as suas necessidades. Estas instituições encontravam-se, por vezes, altamente

congestionadas, num tempo de pandemia, em que as precauções para evitar possíveis contágios deverão ser redobradas.

2.3. Oportunidades (*Opportunities*)

2.3.1 Formação contínua

Na Farmácia Santa Isabel tive oportunidade de aprofundar os meus conhecimentos de farmacologia e indicação farmacêutica através do estudo de fluxogramas cuidadosamente compilados para estudo e consulta por parte de colaboradores e estagiários.

Durante o meu período de estágio tive inclusivamente a oportunidade de assistir a formações no âmbito de cuidados de veterinária, nomeadamente indicação e aconselhamento de suplementos para animais de companhia e também a uma formação em primeiros socorros em caso de paragem respiratória.

As formações ocorreram também virtualmente sob a forma de *webinars* e, recorrendo a esta plataforma, tive oportunidade de assistir a formações sobre produtos de proteção solar e cuidados de pele durante o período de verão, o que se revelou útil para relembrar e aprofundar conhecimentos acerca destes produtos e diferentes práticas a adotar de uma forma profilática para impedir a ocorrência de patologias e danos para a pele. Estas sessões de aprendizagem demonstraram-se também imprescindíveis para a melhoria do atendimento e aconselhamento prestado aos utentes da farmácia.

2.3.2 Associação a uma instituição

A Farmácia Santa Isabel encontra-se associada a uma instituição de solidariedade social, auxiliando através da gestão de receituário e dispensa de medicação adequada às necessidades das utentes.

Assim, durante o meu período de estágio, auxiliei os colaboradores da farmácia na gestão do receituário, escrita de posologia nas embalagens de forma a facilitar a sua correta utilização e ainda criação de uma base de dados em suporte informático para o ano de 2020, a partir de uma base de dados previamente existente em papel, de modo a proporcionar rápido e eficaz acesso ao histórico de medicamentos dispensados a utentes pertencentes a esta instituição. Este projeto permitiu-me assim expandir o meu conhecimento do *software*

Sifarma 2000® e da farmacologia de medicação variada e em simultâneo prestar apoio a uma instituição de solidariedade social.

2.4. Ameaças (*Threats*)

2.4.1 Pandemia por COVID-19

No primeiro trimestre do presente ano de 2020 ocorreu o contágio em massa por parte de um vírus do grupo coronavírus, vulgarmente conhecido por SARSCoV-2. A pandemia em larga escala que assolou o nosso país teve severas consequências sociais e económicas, paralisando Portugal durante um período de 4 meses.

Assim, o meu estágio curricular que se deveria ter iniciado em abril, iniciou-se somente em junho, por constrangimentos que respeitavam não só a dificuldade dos colaboradores em orientarem novos estagiários em tempo de pandemia, como também para própria proteção dos estudantes da Universidade de Coimbra.

A farmácia comunitária a que cheguei encontrava-se ainda marcada pelas medidas de proteção que tive de adotar, como a utilização de máscara durante todo o período de estágio, a utilização de placas de acrílico como forma de minimizar o contacto entre os colaboradores da farmácia e utentes potencialmente contaminados e ainda as medidas de desinfeção das mãos e do espaço de trabalho.

O alarme de alguns utentes da farmácia perante ajuntamentos de pessoas e a criação de filas à entrada da farmácia, por limitação do número de pessoas no seu interior, constituiu por vezes uma ameaça ao bem-estar do utente, algo que nesta conjuntura se faz sentir na maioria dos estabelecimentos e instituições de saúde.

A constrição das condições de trabalho pelas precauções a adotar devido à pandemia revelou-se também uma ameaça. Não obstante a sua obrigatoriedade e salutar utilização para nossa proteção e dos utentes, o equipamento de proteção dificultava a comunicação durante o atendimento ao público e a compreensão de aconselhamento farmacêutico e de pedidos dos utentes. O uso constante de máscara e as práticas de desinfeção danificavam a pele das mãos e face, o que era ainda assim preferível a contrair a infeção por COVID-19.

2.4.2 Desconfiança do utente

Durante o meu período de estágio, nomeadamente durante o atendimento ao público deparei-me com utentes que preferiam ser atendidos por um dos colaboradores, que

conheciam previamente as suas necessidades e estavam capacitados a efetuar um atendimento rápido e conciso, algo que em primeira instância eu era incapaz.

Contudo, com o decorrer do estágio, a familiarização com os medicamentos presentes na farmácia e com o *software* Sifarma 2000[®], bem como a orientação dos colaboradores da Farmácia Santa Isabel permitiu-me agilizar o processo de atendimento e auxiliar os utentes da farmácia de forma ágil e eficaz.

3. Casos Práticos

3.1. Desparasitação animal

Uma utente deslocou-se à Farmácia Santa Isabel, procurando desparasitar os seus cães a nível externo, afirmando desde logo que desconhecia a posologia indicada.

Após indagar o peso dos dois cães, apercebi-me que um era de grande porte (40kg), enquanto o outro era de pequeno porte (5kg), o que condiciona a concentração de princípio ativo a administrar e, por consequência, o produto mais indicado para cada um dos animais.

Assim, a nível externo, indiquei um desparasitante externo comercialmente conhecido por Advantix[®] e composto por uma associação entre imidacloprida e permetrina, indicado para infestações causadas por pulgas, piolhos e carraças não só como desparasitante, mas como repelente de futuras infestações. Uma vez que os pesos dos animais eram diferentes a concentração seria também diferente, o que se traduz em diferentes volumes da pipeta e envolveu a compra de Advantix[®] [2] específico para os dois pesos, cada embalagem com 4 pipetas, com administração de uma pipeta por mês.

3.2 Pirose e desconforto gastrointestinal

Um utente deslocou-se à Farmácia Santa Isabel queixando-se de uma sensação de má disposição e ardor na região do esófago, que ocasionalmente afetava a região faríngea. Após questões acerca da recorrência destes sintomas e em que circunstância ocorriam, apercebi-me que se tratava de pirose ou azia.

Perante isto, optei por aconselhar a toma de Kompensan[®] [3], uma associação entre duas moléculas com propriedade antiácida, o carbonato de hidróxido-alumínio e carbonato de sódio, que mitigam a sensação de ardor do utente. Indiquei que deveria começar por tomar um comprimido para chupar entre as refeições e antes de deitar, advertindo que não deveria

comer duas a três horas antes de adormecer, moderar o consumo de café e ainda chocolate e alimentos excessivamente condimentados. Informe-me ainda que efetuar refeições em horários regulares e evitar situações de stress poderiam ajudar no alívio da sintomatologia.

4. Considerações Finais

No final do estágio curricular na Farmácia Santa Isabel posso concluir que ganhei competências que serão indubitavelmente úteis para o meu futuro profissional. Destas competências destacam-se o manuseamento do *software* Sifarma 2000®, nomeadamente do módulo de atendimento, receção e gestão de encomendas, a prestação de serviços farmacêuticos, a aprendizagem na prestação de aconselhamento farmacêutico e o aumento de competências na área das relações interpessoais, no que respeita à relação entre utente e farmacêutico.

A Farmácia Santa Isabel destaca-se pelo seu foco em produtos e medicamentos de uso veterinário, o que me permitiu expandir os meus conhecimentos nesta área, que se encontra omnipresente, em maior ou menor escala, em todas as farmácias. Destaca-se também pelos seus colaboradores que tudo fazem para assegurar o bem-estar dos utentes, razão pela qual muitos regressam e são utentes regulares desta farmácia de oficina.

De igual modo, o apoio que me foi dado foi absolutamente indispensável para a retenção e aprendizagem de uma ampla variedade de conhecimentos inerentes à profissão farmacêutica, desde aconselhamento farmacêutico até reposição de *stocks* e mesmo preparação de manipulados.

Desde o início do meu estágio curricular que me senti completamente integrado, pelos colaboradores, que sempre me ajudaram e nunca hesitaram em responder às minhas questões, e também pela diretora técnica, Dra. Ana Baptista, que me integrou e me ensinou princípios de atendimento e *back-office*, participando ativamente na orientação do meu estágio e nunca negando auxílio ou esclarecimento de dúvidas.

Por tudo isto, apenas tenho de agradecer o acolhimento e ensinamentos que me transmitiram. Concluo que este estágio se tratou de um período de crescimento a nível pessoal e profissional, superando largamente quaisquer expectativas que poderia ter criado.

5. Bibliografia

1. INFARMED – Regula a prescrição e a preparação de medicamentos manipulados (2004). [Acedido a 25 de setembro de 2020]; Disponível em: http://www.infarmed.pt/documents/15786/1070327/067-ADL_95_2004.pdf 5;
2. BAYER – Bula do Medicamento Advantix (2017) [Acedido a 26 de setembro de 2020]; Disponível em: https://www.bayer.pt/static/documents/pdf/animal-health/advantix%2010-25kg_it_v_0115_001_dgav_2017_09_21.pdf
3. INFARMED – Resumo das Características do Medicamento, Kompensan (2014) [Acedido a 26 de setembro de 2020]; Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml#>

Parte III

Monografia

“Vacinas Terapêuticas contra o Cancro”

Lista de Abreviaturas

ALK – Cinase Anaplástica do Linfoma

APC – Células Apresentadoras de Antígenos

bFGF – Fator de Crescimento Básico dos Fibroblastos

BRAF – Proteína Cinase Serina-Treonina

CEA – Antígeno Carcinoembrionário Humano

cGAS/STING – Sintetase de GMP-AMP cíclico/ Estimulador de Genes de Interferão

CPI – Inibidores das Proteínas de Checkpoint Imune

CpG – Par Citosina-Guanina

CTLA-4 – Proteína 4 associada ao Linfócito T Citotóxico

DC – Célula Dendrítica

DNA – Ácido Desoxiribonucleico

EGF – Fator de Crescimento Epidermal

FDA – Food and Drug Administration

Gal- α – Galactose-alfa-1,3-galactose

GM-CSF – Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos

GP2 – Glicoproteína do Grânulo de Secreção Pancreática

HER2 – Recetor 2 da Tirosina Proteína Cinase

HGFR – Fator de Crescimento do Hepatócito

HLA – Antígeno Leucocitário Humano

HMGB-1 – Proteína box I do grupo de alta mobilidade

HPV E6 – Oncoproteína 6 do Papiloma Vírus Humano

HPV E7 – Oncoproteína 7 do Papiloma Vírus Humano

Hsp – Proteínas de Choque Térmico

HuR – Antígeno humano R

IFN- α – Interferão alfa

IFN- γ – Interferão gamma

IgG2 – Imunoglobulina G2

IL-2 – Interleucina 2

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

IL-12p70 – Interleucina 12 com heterodímero ativo p70

IL-18 – Interleucina 18

iNOS – Óxido-Nítrico Sintetase induzida por citocinas

JAK2/STAT3 – Cinases de Janus/Transdutor de sinal e ativador de proteínas de transcrição
3

LRMK – Peptídeo Longo Li-Key

MEK – Cinase da proteína de mitogénese ativada

Melan-A – Antígeno de melanoma reconhecido pelas células T

MGMT – Metiltransferase da DNA-O6-Metilguanina

MHC – Complexo Major de Histocompatibilidade

mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro

MSDC – Células mielóides imunossupressoras

NADPH – Fosfato Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida

NY-ESO-1 – Antígeno do carcinoma celular escamoso esofágico de Nova Iorque

PI3K/mTOR – Cinase de 3-fosfoinosítido/ Alvo de rapamicina para mamíferos

PAP – Fosfatase Ácida Prostática

PDI – Antígeno de morte programada I

PD-L1 – *Programmed Cell Death Ligand 1*

PD-L2 – *Programmed Cell Death Ligand 2*

PS – Fosfatidilserina

PSA – Antígeno específico da Próstata

PTX-3 – Proteína Pentraxina-3

RAG-2 – Gene Ativante de Recombinação 2

RNA – Ácido Ribonucleico

SCCHN – Carcinoma celular escamoso de cabeça e pescoço

TAA – Antígenos associados a tumores

TGF- β – Fator de transformação de crescimento beta

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

TLR9 – Recetor tipo Toll 9

TSA – Antígeno específico tumoral

UV – Ultra-Violeta

VEGF – Fator de Crescimento Vascular Endotelial

WT-1 – Péptido do tumor de Wilms I

Resumo

A imunoterapia é uma área em constante evolução, que pode ser aplicada como estratégia terapêutica para diferentes tipos de cancro, seja como adjuvante de terapias convencionais, como a radioterapia ou a quimioterapia, seja em monoterapia, maioritariamente na forma de vacinas. Estas vacinas têm como objetivo a sensibilização do sistema imunitário para antígenos específicos da superfície celular de células tumorais, promovendo assim uma resposta dirigida para o tumor.

Algumas áreas de destaque no desenvolvimento de vacinas antitumorais são as vacinas baseadas nos lisados de célula tumoral inteira, na utilização de células dendríticas sensibilizadas para os antígenos tumorais, na utilização de DNA e RNA para expressão de antígenos suscetíveis de desencadear processos de morte celular e ainda a utilização de péptidos para o recrutamento de células do sistema imune através de interação com diferentes recetores.

Nas duas últimas décadas, muitos foram os estudos e ensaios clínicos que exploraram soluções terapêuticas para diferentes tipos de cancro e o progresso atingido foi significativo. Nesta monografia, são sumarizados os diferentes tipos de vacinas antitumorais, bem como as características-chave do ambiente tumoral que induzem processos de imunoedição e de escape a mecanismos de imunidade inata e adquirida. Adicionalmente, são apresentados diferentes estudos e ensaios clínicos indicativos de possíveis aplicações destas vacinas e ainda alternativas inovadoras, que se concentram em estratégias de terapia personalizada, e que possivelmente desvendam o próximo capítulo da terapêutica antitumoral.

Palavras-chave: Vacinas; Cancro; Sistema Imunitário; Imunoterapia; Imunoedição.

Abstract

Immunotherapy is an evolving field, that can be applied as a therapeutic strategy to different types of cancer, either as an adjuvant to conventional therapies, such as radiotherapy or chemotherapy, or as a monotherapy solution, mainly in the form of vaccines. These vaccines aim to sensitize the human immune system to antigens that are specific to the tumoral cell surface, therefore, promoting a targeted response to the tumor.

Some prominent areas in the development of these vaccines are vaccines based on whole tumoral cell lysate, on dendritic cells sensitized for tumoral antigens, on DNA and RNA, that code antigens capable of promoting cellular death processes and based on peptides that present specificity for key receptors that enable recruitment of different types of immune cells.

In the past two decades the amount of studies and clinical trials that explored immunotherapeutic solutions to different types of cancer is vast, and the progress achieved is significant. In this work, an overview of the different types of vaccines is given, as well as key characteristics of the tumoral microenvironment that enable mechanisms of immune-editing and escape from innate and adaptive immunity systems. Additionally, promising clinical trials and studies are presented as possible applications of these vaccines and innovative alternatives, that focus on personalized cancer therapy, unveiling a possible future in antitumoral therapy.

Key words: Vaccine; Cancer; Immune System; Immunotherapy; Immunoediting.

I. Introdução

As vacinas terapêuticas antitumorais apresentam-se como parte da solução para uma terapia anticancerígena bem-sucedida, sendo exemplos as vacinas do lisado tumoral, vacinas baseadas em células dendríticas (DCs), em neoantígenos, em ácidos nucleicos, entre outras. Juntamente com novas vertentes da imunoterapia, um grande número de vacinas encontra-se em investigação e desenvolvimento ou em ensaios clínicos, no sentido de avaliar a sua capacidade de melhorar as perspectivas de sobrevivência do doente. [1]

As células somáticas encontram-se em risco iminente de transformação em células cancerígenas e, por esta razão, os organismos vivos estão imbuídos de mecanismos de vigilância que são da responsabilidade do sistema imune. [2] Estes mecanismos consistem no controlo da infeção por patógenos oncogénicos, a diminuição de estados de inflamação local com o objetivo de diminuir a possibilidade de formação de um microambiente inflamatório tumorigénico crónico, que potencia o desenvolvimento do tumor e ainda a eliminação de células com mutações que poderão conduzir à formação de um tumor. [2] Apesar de alguns tumores sólidos demonstrarem capacidade para evitar a deteção e erradicação por parte do sistema imunitário, o sistema imunitário tem ainda assim capacidade para reagir à presença do tumor juntamente com terapias antitumorais, de forma a que um estado de equilíbrio sem progressão ou mesmo de regressão seja alcançado. [3,4]

Ao contrário dos tratamentos antitumorais convencionais, como a quimioterapia e a radioterapia, a imunoterapia disponibiliza um conjunto diversificado de mecanismos de modulação do sistema imunitário do indivíduo. Este tipo de tratamento tem como principal objetivo o fortalecimento deste sistema, de forma a que exista uma ação ao nível do microambiente tumoral, com ataque e eliminação de células do tumor e consequente impedimento da sua progressão. [1]

Uma das aplicações da imunoterapia em células tumorais é a vacinação terapêutica antitumoral, que se distingue da vacinação preventiva antitumoral pela sua ação reativa face à presença de um tumor. A imunoterapia revela maior efetividade por ter como alvo um tumor já formado, procurando eliminar a heterogeneidade tumoral como fator limitante da terapêutica. [1,5] Esta é uma promissora estratégia de mitigação da progressão tumoral, que depende da ativação de células do sistema imune adaptativo, específicas para deteção e eliminação das células tumorais. [5]

Neste trabalho apresentam-se os principais tipos de vacinas antitumorais e ainda alguns estudos e ensaios clínicos promissores em diferentes tipos de cancro. São também descritas

peculiaridades do ambiente tumoral que condicionam a aplicação destas vacinas, bem como estratégias alternativas no campo da imunoterapia, com potencial para substituir ou coadjuvar a aplicação de vacinas antitumorais.

2. Ambiente tumoral

Os tumores são compostos por células cancerígenas e não cancerígenas. Entre as diferentes células não cancerígenas incluem-se fibroblastos, células do sistema imune, células endoteliais e ainda células específicas do órgão em que se encontra o tumor, como astrócitos no tecido nervoso ou osteoblastos no tecido ósseo. Este agregado celular denomina-se estroma tumoral e, juntamente com condicionantes como o pH, constituição da matriz extracelular ou concentração de oxigênio, constitui o ambiente tumoral. Abordar-se-ão, de seguida, algumas das principais características que constituem o ambiente tumoral e que representam obstáculos a estratégias de imunoterapia. [6,7]

2.1. Células endoteliais e Angiogénese Tumoral

As células endoteliais constituem as paredes dos vasos sanguíneos presentes no tumor, que são críticos para a distribuição de diferentes nutrientes e oxigênio, representando a principal via para saída de metabolitos e células cancerígenas com potencial de metastização. O conjunto de vasos sanguíneos, que irrigam o tumor, apresenta-se irregular e desorganizado, o que conduz a variações no transporte de oxigênio e metabolitos, que se traduz, por sua vez, na alteração das condições ambientais do tumor. [6]

A obtenção de energia pelas células tumorais ocorre maioritariamente por glicólise e não por fosforilação oxidativa, como modo de sobrevivência face à escassez de oxigênio, o que contribui para a produção de diversas moléculas que estimulam a proliferação celular, como o fosfato dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) e diversos ácidos nucleicos. Em contrapartida, é possível assistir a um aumento dos níveis de lactato, o que gera uma diminuição de pH, característica do ambiente tumoral. [6]

A angiogénese tumoral ocorre por meio de *angiogenic switch*, que varia de acordo com o tipo e estágio do tumor e ainda com as características do ambiente tumoral. Este estímulo que potencia a angiogénese mantém-se continuamente ativo, o que potencia a criação de vasos sanguíneos e a proliferação tumoral. [6,7]

As células endoteliais nem sempre formam uma monocamada e possuem baixa coesividade intercelular, pelo que a sua baixa função de barreira se reflete num caótico e hemorrágico fluxo sanguíneo. Os vasos sanguíneos tumorais apresentam um aspeto tortuoso, devido à compressão de células endoteliais pelo restante estroma tumoral e pela pressão exercida pela quantidade elevada de fluido intersticial, que pode provocar o seu colapso ou impedir a normal circulação sanguínea. A deficiente circulação sanguínea é uma das causas do ambiente ácido e hipóxico do tumor (Fig.1). [7]

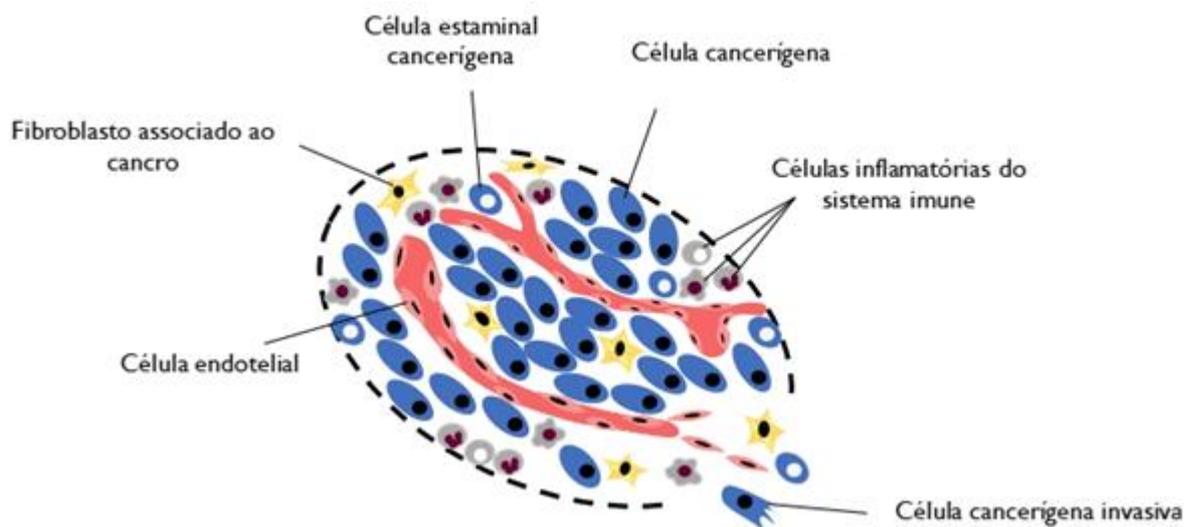


Figura 1. Imagem ilustrativa dos principais grupos de células características do ambiente tumoral dos tumores sólidos. Os vasos sanguíneos tumorais apresentam uma arquitetura caótica com células endoteliais organizadas de forma conducente ao extravasamento plasmático para o estroma tumoral. O tumor é maioritariamente constituído por células tumorais, com grande capacidade de replicação e promoção do crescimento e progressão tumoral, mas também por elementos do sistema imunitário, com ação inibitória do seu desenvolvimento. (Adaptado de *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*). [3]

A estrutura aberrante dos vasos sanguíneos e a sua rápida proliferação pode ser causada pela expressão modificada de fatores de angiogénese, como o fator de crescimento básico dos fibroblastos (bFGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), interleucina-8 (IL-8), angiopoetinas, entre outros. [7]

As células endoteliais apresentam também capacidade para sobreexpressar o fator de crescimento vascular endotelial A (VEGF-A), o que resulta de uma proteína denominada antígeno Hu (HuR) que, ligando-se ao mRNA do VEGF, provoca a sua estabilização citoplasmática, permitindo um aumento da sua tradução. Assim, a presença de HuR nestas células encontra-se diretamente relacionada com a malignidade do tumor, porque gera um aumento da vascularidade tumoral, contribuindo para a sua proliferação. [8]

A existência de uma elevada concentração citocinas e também fatores de crescimento no ambiente tumoral pode ser uma das causas de geração de mudanças epigenéticas adicionais, não só em células tumorais como em células endoteliais tumorais, que potenciam a sua sobrevivência a fármacos antiangiogénicos. [7]

2.2. Inflamação e Células do Sistema Imunitário

Os tumores são constituídos por células infiltrantes provenientes do sistema imunitário, com capacidade de produção de moléculas indutoras de inflamação. Estas células poderão ter um efeito antagonista da progressão tumoral ou promotor da mesma. Alguns tipos de células, como macrófagos, mastócitos, neutrófilos e também linfócitos B e linfócitos T, são produtores de moléculas como VEGF, fator de crescimento epidermal (EGF) e outros fatores promotores da angiogénese, bem como citocinas e quimiocinas, que exacerbam o estado de inflamação do ambiente tumoral. Consequentemente, pela produção dos fatores mencionados, estas células apresentam capacidade de promoção da proliferação de células tumorais, manutenção e proliferação de angiogénese tumoral, que provoca a dispersão de células com potencial para a metastização, devido à promoção do desenvolvimento de vasos sanguíneos no tumor. [6]

O tumor encontra-se habitualmente em estado de inflamação, devido não só a moléculas produzidas pelas células do sistema imune, mas também pelas próprias células tumorais, que ativam vias que originam a sobreexpressão de citocinas e quimiocinas. A inflamação é uma característica do ambiente tumoral que poderá ter uma origem intrínseca, em que por ativação de oncogenes se geram fatores de transcrição ou proteínas, que por sua vez promovem a produção excessiva de moléculas indutoras de inflamação. A origem do processo inflamatório poderá ser também extrínseca, em que células que migram para o ambiente tumoral produzem estes mesmo fatores, originando moléculas como quimiocinas, citocinas e prostaglandinas. [9]

No estroma tumoral existem também algumas células parcialmente diferenciadas. Estas células encontram-se num estado intermédio entre células indiferenciadas presentes na medula óssea e células totalmente diferenciadas do sistema imune, também existentes em tecidos não tumorais com ou sem inflamação. Denominam-se células mielóides imunossupressoras (MSDC) e são precursoras de células como monócitos ou neutrófilos, apresentando capacidade de induzir inflamação e promover angiogénese, mas também de inibir a ativação de linfócitos T e células NK e ainda suprimir a maturação de DCs, que terão ação

no tumor. Esta supressão ocorre por produção de moléculas como a arginina e também por ação da óxido-nítrico sintetase induzida por citocinas (iNOS), que anulam a atividade efetora de células NK e T para células tumorais (Fig.1). [10]

2.3. Imunovigilância e Imunoedição

A imunovigilância consiste na promoção de mecanismos preventivos da ocorrência de tumores e do desenvolvimento tumoral pelo sistema imunitário, através de imunidade inata e adquirida. Um teste elucidativo relativamente à importância de imunovigilância no combate ao tumor foi desenvolvido em modelos animais, que careciam do gene ativante de recombinação 2 (RAG-2), responsável pela ativação da proteína recombinase. Em caso de subexpressão do RAG-2 em células do sistema imune, estes modelos demonstraram tendência para o rápido desenvolvimento de tumores. Assim, este gene contribui para o rearranjo do perfil de recetores de antigénios de diferentes células do sistema linfóide, pelo que, na sua ausência é impossível ocorrer uma resposta imune efetiva face à progressão tumoral, o que demonstra a importância das células do sistema imune para a prevenção da ocorrência de tumores. [11]

Contudo, para além de promover o controlo do desenvolvimento tumoral, as células tumorais podem, paradoxalmente, promover o desenvolvimento do próprio tumor através de um processo denominado imunoedição. A imunoedição divide-se em fase de eliminação, equilíbrio e, por fim, fase de escape. [12]

Na fase de eliminação, as células pertencentes ao sistema de imunidade inata e adquirida, reconhecem e eliminam células que sofreram transformações e escaparam aos mecanismos celulares de reconhecimento e supressão tumoral. Na fase de equilíbrio, clones de células tumorais eliminadas, que sobreviveram aos mecanismos de eliminação do sistema imune, avançam para a fase de equilíbrio onde a progressão tumoral é limitada e as células permanecem num estado de latência. A pressão constante exercida pelo sistema de imunidade adquirida e a tendência mutagénica das células tumorais, que resulta da sua instabilidade genética, conduz a um possível escape de células tumorais, que contornam os mecanismos de reconhecimento e destruição do sistema imunitário. A seleção pode ocorrer, não só por morte de células tumorais com maior imunogenicidade, mas também por modificação do perfil de antigénios destas células, que se reflete na subexpressão de antigénios como o *Programmed Cell Death Ligand 1* (PD-L1) ou na perda de capacidade de apresentação a células do sistema imune. Estas células tumorais imunoeditadas entram na fase de escape devido a estas

modificações, proliferando sem restrições, o que conduz ao crescimento do tumor até este se revelar clinicamente aparente. [12]

Este processo de imunoeedição é uma característica de grande importância do ambiente tumoral, uma vez que ocorre naturalmente durante o desenvolvimento do tumor, mas também como resposta a imunoterapia. Assim, existem tumores que expressam resistência a imunoterapia de uma forma inata ou adquirida. A resistência inata define-se como uma ausência de resposta objetiva a diferentes técnicas de imunoterapia. Pode ocorrer por imunossupressão do indivíduo, mas também pela existência de tumores cujas células tumorais apresentem um perfil antigénico pobre em moléculas que permitam um reconhecimento por células do sistema imune e ainda células tumorais imunoeditadas e que escapem ao sistema imune durante o desenvolvimento tumoral. A resistência adquirida pode ser definida como a diminuição gradual da efetividade da imunoterapia. Ocorre, por exemplo, quando células tumorais de um tumor em desenvolvimento entram em fase de equilíbrio durante o tratamento imune, passando subsequentemente a uma fase de escape que diminui a eficácia da imunoterapia. [12]

Para que esta barreira à terapia imune seja ultrapassada é necessária uma compreensão profunda dos mecanismos de resistência e de que forma se encontram ligados ao ambiente tumoral durante o tratamento, sendo ainda necessário o entendimento das semelhanças das vias de resistência entre diferentes tipos de cancro, de modo a encontrar uma solução transversal, que permita o aumento da eficácia da imunoterapia. [12]

3. Tipos de vacinas antitumorais

3.1. Vacina de célula tumoral inteira (*Whole tumoral cell vaccine*)

As vacinas de células tumorais inteiras apresentam-se como um método eficaz de disponibilização de uma ampla diversidade de antígenos tumorais, evitando o processo de identificação e teste de neoantígenos ou antígenos associados a tumores (TAA). Este tipo de vacina poderá desencadear uma forte resposta antitumoral, reduzir a possibilidade de reincidência do tumor e reduzir os efeitos da capacidade de imunoeedição tumoral. [13]

No âmbito da terapia imunogénica para diferentes tipos de cancro, as vacinas de células tumorais inteiras trazem benefícios pela sua capacidade de abranger uma grande quantidade de antígenos na forma de um único lisado de células tumorais, permitindo assim uma atuação eficaz na maioria das células de um tumor em crescimento. Esta funcionalidade traduz-se, em

certa medida, na diminuição da possibilidade de escape das células cancerígenas à ação do sistema imunitário, por mecanismos promovidos pelo ambiente tumoral.

Como em tantos outros tipos de vacinas, a principal barreira surge na incapacidade de ativar a resposta imune, por geração de sinais inibitórios não conhecidos por completo, que inativam linfócitos T e células apresentadoras de antígenos (APC) e impedem o reconhecimento de antígenos por parte das células do sistema imunitário. [14]

O reconhecimento tumoral por parte do sistema imunitário ocorre através de um conjunto de antígenos associados a tumores. Apesar de a vacinação baseada em TAAs específicos se apresentar como uma opção viável, uma alternativa a este tipo de vacinação consiste nas vacinas de lisados tumorais. Estas vacinas apresentam uma grande variedade de antígenos na sua composição, uma vez que os lisados tumorais têm origem em células tumorais, que são abundantes em TAAs caracterizados ou por caracterizar. Assim, a prevalência de epítomos para células CD8+ com ação citotóxica e ainda células CD4+ é elevada, permitindo a apresentação de antígenos tumorais ao Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC) de classe I e 2, o que maximiza a resposta imunitária antitumoral e promove a formação de células de memória do tipo CD8+ através das células auxiliares CD4+. [14]

Outros fatores relevantes para a utilização destas vacinas são a diminuição da capacidade de escape das células tumorais à ação do sistema imunitário, em comparação com as vacinas que utilizam um único epítomo e ainda a eliminação da necessidade de definir e selecionar os epítomos que provocam maior ação antitumoral. [14]

Este tipo de vacina pode dividir-se em autóloga e alogénica. Uma vacina autóloga é composta pelo lisado tumoral extraído do paciente, que é vacinado com os mesmos antígenos que o seu próprio tumor expressa. Este tipo de vacinação apresenta-se como uma técnica limitada, uma vez que a colheita e a preparação do lisado tumoral a partir de células do próprio indivíduo pode mostrar-se dispendiosa e demorada. [14] A vacinação alogénica procura solucionar a questão da individualização da terapêutica e consiste na preparação de linhas celulares provenientes de diferentes tumores, com o objetivo de aumentar a probabilidade de partilha de antígenos entre a vacina e o tumor do paciente. Uma das principais preocupações associadas a este tipo de vacinação é a possibilidade de existir um desfasamento entre o MHC do paciente e das linhas celulares presentes na vacina. Este fenómeno desencadearia uma reação do sistema imunitário do paciente às moléculas do MHC estranho, em detrimento dos antígenos tumorais. Contudo, embora estas reações por vezes ocorram, comprovou-se que este desfasamento não inibe a resposta tumoral, promovendo até a ação das APC. [14]

A produção de vacinas baseadas em células tumorais inteiras ocorre segundo diferentes métodos, devido à grande quantidade de antígenos das células tumorais, adaptados para induzir tolerância imune. [14]

3.1.1. Vacinas baseadas em exossomas tumorais

Os exossomas são vesículas com origem em endossomas ou outros corpos multivesiculares do meio intracelular, sendo habitualmente secretados por processos de exocitose, a partir de uma miríade de células, incluindo células tumorais. Em ambiente tumoral, os exossomas contêm um perfil proteico diferente da membrana celular da célula que os originou, encontrando-se enriquecidos em antígenos e moléculas responsáveis pela apresentação de antígenos ao MHC de classe I e 2. [14,15]

O efeito imunogénico deste tipo de vesículas de origem tumoral é incrementalmente elevado quando as células cancerígenas das quais são extraídas foram sujeitas a condições de stress. Um exemplo deste fenómeno é a extração de exossomas a partir de células tumorais que sofreram stress, gerando *heat-shock proteins* (Hsp), nomeadamente Hsp 70, que provocam um aumento da migração para o local do tumor, da atividade citolítica das células NK. [14,16]

As Hsps atuam ainda como imunomoduladores, apresentando-se como um sinal de perigo à superfície dos exossomas tumorais e aumentando a secreção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em macrófagos, no sentido de iniciar uma resposta imunológica a um fenómeno localizado, indutor de stress. [14,17]

3.1.2. Vacina baseada em lisado de célula tumoral necrótica

Este é um método que envolve a criação de um lisado a partir de células tumorais, submetidas a um processo de necrose, através de ciclos de congelamento-descongelamento (*freeze-thaw cycles*). Como resultado, esta vacina contém uma mistura do conteúdo intracelular, que inclui ácidos nucleicos, organelos celulares, mitocôndrias e fragmentos da membrana celular. [14]

Estudos comprovaram que esta vacina tem capacidade de indução da maturação de DCs, sem qualquer estímulo adicional, provavelmente devido à presença de imunomoduladores como Hsp, presentes nas células tumorais que sofreram necrose. A ligação de recetores tipo toll 4 (TLR-4), presentes nas DCs, a recetores da proteína box I do grupo de alta mobilidade (HMGB-1), presentes no lisado tumoral, previne ainda a degradação de

antígenos tumorais e facilita a sua circulação para os locais de apresentação de antígenos. [14]

As vacinas baseadas em lisados de células tumorais necróticas podem ser administradas diretamente no organismo, sem administração conjunta de DCs sensibilizadas para o lisado, sendo que adjuvantes poderão ser associados à vacina para potencializar a sua ação. [14]

3.1.3. Vacinas baseadas em células tumorais apoptóticas

Um método alternativo para produção de vacinas de células tumorais inteiras é a utilização de radiação ultravioleta (UV) para promover apoptose em células tumorais. Como resultado do fenômeno apoptótico, os fosfolípidos presentes na membrana celular perdem a sua assimetria, o que provoca a exposição de moléculas de fosfatidilserina (PS) a nível externo. As DCs contêm recetores de PS, que promovem a captação de células tumorais e a apresentação dos seus antígenos, pelo que a exposição de PS à superfície das células tumorais facilita o seu reconhecimento e a ação do sistema imunitário. [14]

Uma vantagem adicional que decorre da utilização de células tumorais apoptóticas é a presença de calreticulina à superfície da célula em apoptose, uma proteína responsável pela homeostase e regulação dos sinais iónicos de cálcio, que é um fator importante na promoção da atividade de macrófagos e DCs. [14]

Fases avançadas do processo de apoptose em células tumorais promovem a produção da proteína pentraxina-3 (PTX-3) por parte de DCs maturadas. A PTX-3 promove a produção de citocinas e impede a ocorrência de uma resposta autoimune, através da restrição da apresentação de antígenos, que derivam do reconhecimento de células em apoptose. Na presença de células em apoptose, a PTX-3 promove a libertação de interleucina 10 (IL-10) e TNF- α e induz um aumento da produção do fator de transformação do crescimento β (TGF- β) por parte de DCs. Esta proteína encontra-se, por um lado, ligada à DC em desenvolvimento e, por outro, à membrana celular da célula em apoptose. A PTX-3 não se liga aos fragmentos resultantes da apoptose, estabelecendo, contudo, a ligação entre a célula fagocitária e a célula tumoral durante todo o processo de morte celular programada. [14]

3.1.4. Aplicações

As vacinas de lisado de célula tumoral inteira possuem diferentes aplicações. Uma aplicação relevante surgiu na sequência de um estudo (Xiang Yu *et al.*, 2020) [18] através da associação de nanopartículas compostas por melitina como distribuidoras de lisados tumorais que, como referido anteriormente, providenciam uma grande diversidade de antigénios, contornando assim a complexa tarefa de identificar antigénios de forma individual para cada tipo de cancro estudado. Adicionalmente, por compreender uma maior variedade de antigénios, o lisado tumoral poderá promover uma resposta imune mais eficaz, reduzindo ainda a probabilidade de escape do tumor a mecanismos de imunovigilância e diminuindo a probabilidade de ressurgimento do tumor. [18]

A melitina é uma proteína que tem origem no veneno de abelha, e que possui atividade antitumoral pela indução de fenómenos de necrose e apoptose em tecidos tumorais e através de alterações membranares, que permitem a libertação intracelular dos antigénios tumorais em células APC. A vacina, inoculada a nível intratumoral, tem como alvo os nódulos linfáticos, ativando APCs, que, por sua vez, desencadeiam uma resposta imune antitumoral. A injeção intratumoral potencia a capacidade apoptótica da melitina, conduzindo à morte das células tumorais e à libertação de uma maior quantidade de antigénios, contribuindo para uma resposta imune aumentada. Num estudo em que se testou esta formulação em modelos animais, murganhos tratados com a vacina sofreram uma redução de 95% no tamanho do tumor primário, ocorrendo também diminuição de tumores distantes na ordem dos 92%, num modelo terapêutico de melanoma. [18]

Assim, as nanopartículas de melitina apresentam um duplo efeito que potencia a resposta imune face ao tumor. Pela sua atividade apoptótica, a melitina contribui para a libertação de antigénios *in situ*, por morte de células tumorais e, pelo seu tamanho ideal, as nanopartículas de melitina são drenadas pela linfa onde atingem os nódulos linfáticos, o que permite a ativação de APCs e o desenvolvimento de uma resposta imune antitumoral. [18]

Outra aplicação das vacinas antitumorais que recorrem a lisado tumoral de célula inteira ocorreu no âmbito de um estudo (Dabing Xue *et al.*, 2016), [19] que utiliza este tipo de vacina em associação com o epítipo galactose-alfa-1,3-galactose (Gal- α), que não existe em seres humanos, desencadeando respostas humorais com rapidez e respostas celulares intensas, o que contribui positivamente para a divisão de células T e para a secreção de moléculas determinantes para a resposta antitumoral, nomeadamente TNF- α e IFN- γ . Neste estudo, foram utilizadas linhas de celulares tumorais MDA-MB-231, previamente transfectadas

com o gene recombinado α -1,3-GT, codificante do epítipo Gal- α . As vacinas que recorreram a estas células tumorais demonstraram capacidade de inibir a proliferação tumoral bem como o seu crescimento. Por sua vez, estas células demonstraram ainda capacidade de promover um incremento nos níveis de citocinas libertadas e na resposta imune antitumoral por parte de células efetoras do sistema imunitário. Após inoculação em murganhos, registou-se uma diminuição citocinas com propriedades imunossupressivas e uma promoção da secreção de IFN- γ e também de interleucina 12 com heterodímero ativo p70 (IL-12p70). O IFN- γ apresenta capacidade antitumoral por ativação de diversas células do sistema imune, como células NK, células T efetoras, entre outras. A IL-12 apresenta também propriedades antitumorais pela indução de ativação de células NK e linfócitos Th1. [19]

Assim, pela promoção de secreção de citocinas e pela ativação de células efetoras do sistema imune, é possível inferir a eficácia antitumoral em vacinas que recorram a células MDA-MB-231, transfectadas com o epítipo Gal- α , em murganhos portadores de tumor. [19]

Um exemplo adicional da aplicação deste tipo de imunoterapia, foi desenvolvido num ensaio clínico de fase II (Jacek Mackiewicz *et al.*, 2015),[20] em que a segurança e a eficácia de uma vacina alogénica geneticamente modificada (AGI-101H) é testada, juntamente com interleucina 6 (IL-6) e ainda o recetor para IL-6. Esta vacina apresenta bons resultados relativamente à sobrevivência de pacientes com melanoma em estágios III e IV. De acordo com este estudo, realizado em 77 pacientes, a vacina AGI-101H é uma opção viável. A taxa objetiva de resposta à vacina foi de 28,6%, observando-se uma resposta parcial ou completa. O controlo da doença, obtido por resposta completa, parcial ou por estabilização do melanoma foi observado em 54,5% dos pacientes. A duração de resposta obtida pela utilização de AGI-101H foi em média de 32 meses para pacientes com resposta completa e ainda 6,3 meses para doentes com resposta parcial. Dado o estágio avançado de melanoma, ocorreram 72 mortes, sendo que os sobreviventes obtiveram uma resposta completa ao tratamento. Apesar de os valores não serem diretamente comparáveis com outras estratégias de imunoterapia, abordagens como ipilimumab, o anticorpo para proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico (CTLA-4) registou resposta em 11% dos pacientes, com uma taxa de controlo do melanoma de 28,5% e um tempo médio de sobrevivência de 10,5 meses, enquanto 54% dos pacientes deste estudo com AGI-101H registaram controlo da doença e um terço responderam ao tratamento com um tempo médio de sobrevivência de 17,3 meses. O anticorpo nivolumab, com propriedades imunomodulatórias anti-PD-L1 revelou uma taxa de resposta de 17% numa população total de 52 pacientes em estágio avançado de melanoma e um tempo médio de sobrevivência de 20,3 meses. [20]

O tratamento com AGI-101H revelou-se seguro e a probabilidade de sobrevivência a 5 anos é de 11%, demonstrando resultados promissores no tratamento do melanoma em combinação com diversos anticorpos monoclonais, como os já referidos nivolumab ou ipilimumab ou ainda em conjunto com agentes de normalização das condições de hipoxia do tumor. [20]

3.2. Vacinas com base em peptídeos (*Peptide vaccines*)

As vacinas baseadas em peptídeos apresentam-se como uma opção promissora no tratamento de alguns tipos de cancro, através da indução de reatividade em células T para antígenos tumorais e da possibilidade de aferir o efeito da vacinação, pela monitorização da resposta das células T específicas para os antígenos tumorais. [21]

As células tumorais expressam antígenos peptídicos, constituídos por 8 a 10 aminoácidos, que são reconhecidos por linfócitos T citotóxicos do tipo CD8+. Estes peptídeos são apresentados diretamente ao MHC de classe I. Os antígenos peptídicos com origem tumoral reconhecidos pelo MHC de classe II permitem o reconhecimento de antígenos pelas células T *helper*, do tipo CD4+, sendo compostos por 13 a 18 aminoácidos. [21]

A existência de afinidade por parte dos antígenos peptídicos para com os recetores TLR ou para o MHC é essencial para a produção de células CD4+ e CD8+, de modo a desencadear a resposta imune. [22]

3.2.1. Vacinas com peptídeos curtos e peptídeos longos

As vacinas compostas por peptídeos curtos ligam-se diretamente às moléculas do MHC em células que não são APC, o que poderá ser uma causa de tolerância na resposta dos linfócitos T a esta solução terapêutica. Todavia, peptídeos longos apresentam maior viabilidade, uma vez que devido ao seu comprimento exibem a capacidade de formar uma estrutura proteica terciária, que providencia maior proteção face à possível degradação mediada pela enzima exopeptidase. Estes peptídeos são demasiado longos para apresentação direta ao MHC, existindo necessidade de internalização, por APC, e posterior processamento, o que permite que ocorra uma seleção favorável às APC e, por consequência, ao reconhecimento dos antígenos pelos linfócitos T CD4+. [21]

Os peptídeos longos são também responsáveis pela indução de resposta em linfócitos do tipo CD8+ de memória, ao contrário dos peptídeos com menor comprimento. A indução

de linfócitos CD4+ *helper* com reatividade para epítomos tumorais é imprescindível para o estabelecimento de memória em células T. Em estudos *knockout* para CD4 ou CD40, verificou-se que o controlo tumoral e respostas imunológicas melhoradas foram bloqueadas na ausência das células anteriormente referidas. [21]

Assim, as vacinas baseadas em peptídeos têm algumas vantagens relativamente a outros tipos de vacinas antitumorais, caracterizando-se pela sua facilidade de síntese, segurança, efetividade, termo-estabilidade e efeitos secundários mínimos devido à resposta imune direcionada. [21,23]

As vacinas baseadas em peptídeos curtos degradam-se com maior rapidez após administração, tendo uma efetividade transitória devido a baixa imunogenicidade e baixa solubilidade. As vacinas peptídicas baseadas em peptídeos curtos têm desvantagens adicionais devido à possibilidade de estabelecerem ligações com MHC de classe I pertencentes a células não APC, não ocorrendo uma resposta imunológica ótima à vacina e podendo possivelmente provocar tolerância. Esta limitação deve-se à ausência de estrutura terciária proteica, que decorre do seu tamanho, o que se reflete igualmente numa degradação enzimática rápida. [21,23]

Após a administração da vacina na pele, a apresentação do antigénio tumoral deverá ocorrer por contacto com DCs, que migrarão para os nódulos linfáticos onde apresentarão o antigénio a linfócitos naïve. Porém, no caso das vacinas peptídicas com base em peptídeos curtos, a apresentação aos linfócitos no nódulo linfático encontra-se dependente da sua capacidade para se manter ligado ao MHC, dado que a apresentação do peptídeo ocorre de forma contínua. Assim, a afinidade na ligação entre o MHC e o antigénio curto presente na vacina é um fator determinante para a efetividade da resposta imune. [21]

3.2.2. Vacinas de epítopo único e multipeptídicas

As vacinas peptídicas podem apresentar-se com um só epítopo ou multipeptídicas, quando são desenvolvidas com mais de um epítopo. As vacinas multipeptídicas são desenvolvidas no sentido de contornar obstáculos inerentes ao ambiente tumoral, como a heterogeneidade antigénica e a perda de fenótipo dos antigénios administrados. Em cancros como o melanoma, a expressão de um antigénio poderá não ser exclusiva de todas as células do tumor, existindo perda de antigénios de diferenciação melanocítica ao longo da progressão do cancro e sua expressão somente numa fração dos pacientes. Assim, o tratamento do

melanoma requer a utilização de múltiplos antígenos para induzir uma resposta imune eficaz. [21]

3.2.3. Aplicações

O melanoma maligno constitui uma ameaça crescente, com cerca de cinco casos confirmados por 100 mil indivíduos, sendo que pacientes em estágio III e IV de melanoma maligno têm um elevado potencial de reincidência após excisão inicial do melanoma. Com o intuito de prevenir a reincidência de melanoma, várias estratégias no campo da imunoterapia foram estudadas, incluindo administração de interferão-alfa (IFN- α) em indivíduos com melanoma em estágio III, imunoterapia com inibidores das proteínas de *checkpoint* imune (CPI) e ainda conjugação entre o inibidor do gene da proteína cinase serina-treonina (BRAF) e o inibidor da cinase da proteína de mitogênese ativada (MEK). Os inibidores da cinase e CPI apresentam, porém, problemas de toxicidade e elevado custo, o que limita a sua utilização, sendo que o paciente inoculado com estes compostos poderá não desenvolver uma resposta decisiva ou demonstrar ausência de resposta ao tratamento. [24]

Assim, da necessidade de contornar estes obstáculos pela produção de uma terapia imune de baixo custo e baixa toxicidade, surgiu a hipótese de combinar vacinação peptídica com IFN- α . Num ensaio clínico de fase II (Francesca Urbani *et al.*, 2020), [24] em que se procuraram conjugar os peptídeos do carcinoma celular escamoso esofágico de Nova Iorque (NY-ESO-1) e um antígeno de melanoma reconhecido pelas células T (Melan-A) com IFN- α , foi efetuada a administração dos diferentes peptídeos em locais separados de forma a evitar a competição na ligação ao MHC e, por consequência, diminuir a competição para ligação a células CD8+. Como resultado da administração de Melan-A, ocorreu um aumento da produção de linfócitos CD8+ Melan-A específicos, ocorrendo ainda um aumento dos níveis de interleucina-2 (IL-2) e atividade proliferativa. A administração de IFN- α provocou um aumento de diferentes tipos de células NK, nomeadamente em pacientes não reincidentes, conjecturando-se que exista uma citotoxicidade tumoral, que provoca uma resposta antitumoral mediada por células NK. Em suma, a combinação de vacinação com IFN- α é uma alternativa viável na prevenção da reincidência e parte da terapia do melanoma maligno em estágios avançados, representando uma opção segura, económica e polivalente, uma vez que induz a produção de linfócitos CD8+ específicos para o peptídeo Melan-A e também a promoção da atividade antitumoral de células NK. [24]

Outra possível aplicação das vacinas peptídicas (Tommy A. Brown II *et al.*, 2019)[25] surgiu no contexto do cancro da mama, através do recetor 2 da tirosina proteína cinase (HER2), que tem uma prevalência de 60 a 70%, encontrando-se sobreexpresso em 20 a 30% dos casos deste cancro, o que gera interesse do ponto de vista do desenvolvimento de possíveis estratégias na área da imunoterapia. A vacina com nelipepimut-S é constituída por este epítipo tumoral que deriva do domínio externo do antígeno HER2. O nelipepimut-S induz a ativação de linfócitos CD8+ citotóxicos para HER2, comprovando-se em ensaios clínicos de fase II que se trata de uma alternativa segura e que promove imunidade específica para o antígeno HER2, e um incremento na sobrevivência dos pacientes. [25]

No sentido de explorar peptídeos alternativos com capacidade de induzir respostas imunológicas em células CD4+ *helper* surgiu a vacina com o péptido AE37, que é um peptídeo do MHC de classe II, modificado pela junção entre o peptídeo AE36, que deriva do domínio intracelular do antígeno HER2, e a cadeia de 4 aminoácidos conhecida como o peptídeo longo li-Key (LRMK), que aumenta as propriedades imunogénicas do AE36. [25]

O peptídeo AE37 não apresenta restrições para o antígeno leucocitário humano, o que permite uma utilização alargada a um maior espectro de pacientes. Uma alternativa adicional é a utilização da glicoproteína do grânulo de secreção pancreática (GP2), que deriva do domínio transmembranar do antígeno HER2. [25]

Como resultado de ensaios clínicos de fase II, comprovou-se que os peptídeos AE37 e GP2 apresentam toxicidade limitada, que se deve principalmente à utilização do fator estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) como adjuvante terapêutico. O peptídeo GP2 demonstrou benefícios no tratamento de tumores em que existe sobreexpressão de HER2 e que adicionalmente sofreram tratamento com trastuzumab. O peptídeo AE37 provou ser benéfico em pacientes em estado avançado de cancro da mama, nomeadamente com baixa expressão de HER2. Dado que a principal resposta à vacinação com AE37 é uma resposta por parte de células CD4+ *helper*, esta vacina tem mais que um efeito imunoadjuvante, contribuindo para a geração de uma imunidade a longo prazo. AE37 promove ainda um incremento da resposta de linfócitos T citotóxicos.

Deste modo, a indução de respostas combinadas em linfócitos T citotóxicos e células T *helper*, podem provocar efeitos citolíticos a curto prazo e memória imunológica estimulada pelas células T *helper*, prevenindo a reincidência de cancro da mama. [25]

3.3. Vacinas com base em células dendríticas (*Dendritic Cell Cancer Vaccines*)

As células dendríticas (DCs) são as mais eficazes APCs para respostas primárias a nível imunitário e possuem elevados níveis de antígenos compatíveis com o MHC de classe II, bem como várias moléculas com propriedades de adesão e co-estimulação. Os antígenos poderão ser endogenamente processados após distribuição por proteossomas para o MHC de classe I, enquanto exogenamente o processamento poderá ocorrer pelo MHC de classe II, após distribuição por lisossomas endocíticos. Um mecanismo alternativo de processamento consiste na migração de antígenos endógenos para o MHC de classe I por um mecanismo de *cross-priming*. Adicionalmente, proteínas *chaperones* como as Hsps, poderão ser utilizadas para distribuição de antígenos para o MHC de classe I. [26]

Enquanto células precursoras, as DCs migram a partir da medula óssea para diversos órgãos, onde permanecem imunologicamente inativas. A sua ativação ocorre por estimulação inflamatória, que despoleta uma diferenciação que diminui as suas capacidades de processamento de antígenos, aumentando a expressão de moléculas co-estimulatórias, MHC e outros elementos relevantes para a apresentação de antígenos. Após diferenciação, as DCs migram para órgãos linfóides no sentido de estimularem células T naïve. Esta capacidade de migração para regiões prolíficas em células T é essencial para o desenvolvimento da resposta imune do indivíduo [27]. As DCs revelam-se assim fulcrais para o desenvolvimento e proliferação de células T *helper*, bem como linfócitos T citotóxicos, com especificidade para os antígenos presentes no tumor. [26]

A indução de uma resposta imune por parte de células T com especificidade para um determinado antígeno exige distribuição de dois sinais imunológicos de uma forma coordenada, por parte das DCs. Primeiramente, a informação exclusiva do antígeno é transmitida à célula através de peptídeos do MHC à superfície da membrana extracelular das DCs para os recetores das células T naïve. Seguidamente, ocorre a geração de um segundo sinal pela interação entre células T que expressam o antígeno CD28 e as moléculas com propriedades de co-estimulação que são expressas pelas DCs. [28]

O Sipuleucel-T[®] foi a primeira vacina aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para a terapêutica cancerígena, utilizada em estágios avançados de cancro da próstata, o que iniciou uma nova era na terapêutica antitumoral. Esta vacina utiliza DCs maturadas *ex vivo*. [29]

3.3.1. Pulsação de vacinas baseadas em DCs

As vacinas baseadas em DCs envolvem um processo de pulsação, em que são carregadas com antígenos tumorais e maturadas em condições favoráveis, num ambiente *ex vivo*. As células, resultantes do processo de maturação, são administradas ao paciente com o intuito de desencadear uma resposta imunitária para antígenos específicos. A maturação de DCs *ex vivo* é vantajosa relativamente ao processamento do antígeno *in vivo*, já que há uma diminuição do risco e dificuldades técnicas e um aumento da eficiência da vacinação. [29]

No contexto da vacinação com DCs, existem duas abordagens principais para o reconhecimento de antígenos pelas DCs. A primeira consiste no processamento de um único antígeno específico para o tumor, de forma a induzir a ativação de linhagens de linfócitos T citotóxicos com especificidade para esse mesmo antígeno. Outra abordagem consiste na maturação com lisado tumoral ou derivados para a indução de linhagens policlonais de linfócitos T citotóxicos. Algumas variações da maturação com lisado tumoral são a utilização de DCs pulsadas com peptídeos derivados de antígenos tumorais, restritivos o MHC de classe I, a transfecção de DNA complementar em DCs e ainda a pulsação de exossomas que derivam de DCs maturadas com peptídeos tumorais. A utilização de múltiplos antígenos oferece um conjunto de vantagens relativamente à utilização de um antígeno único. [26]

As vantagens a destacar serão o incremento na quantidade de antígenos apresentados pelas DCs, o que permite uma maior personalização da resposta imune, e também a redução da possibilidade de escape à resposta imune por perda de antígenos por parte das células tumorais. Outra vantagem é a possibilidade de ativar células T CD8+ citotóxicas e CD4+ *helper*. Este fenómeno ocorre pelo aumento do número de antígenos apresentados, que favorece a apresentação a linfócitos T. Pela ativação de células CD8+ e CD4+ temos uma otimização da resposta imune antitumoral. [30]

A pulsação de DCs com antígenos tumorais é um dos principais passos na preparação de vacinas com base em DCs, sendo estas normalmente carregadas com lisados tumorais, através de um processo de ultrasonicação ou múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento, podendo também ser carregadas com antígenos de natureza peptídica, DNA e mesmo exossomas com origem em células tumorais.

Os antígenos são sintetizados com base em epítopos cancerígenos, cuja existência se encontra prevista ou verificada no cancro em tratamento. Contudo, denotam-se fraquezas nesta abordagem, uma vez que os epítopos se encontram restritos de acordo com o tipo de antígeno leucocitário humano (HLA) do tratamento e muitos dos epítopos tumorais não estão

elucidados por completo, sendo que os peptídeos podem também ativar exclusivamente linfócitos CD8⁺ ou CD4⁺. O tempo relativamente curto de semivida destes antígenos limita a duração da apresentação às DCs.

Os exossomas originados a partir de células cancerígenas são abundantes em epítomos tumorais, sendo que as vacinas que utilizam DCs pulsadas com exossomas apresentam eficácia superior em comparação com lisados tumorais, possivelmente devido à ativação da via da Sintetase de GMP-AMP cíclico/ estimulador de genes de interferão (cGAS/STING). A ativação destas vias incita maior maturação de DCs e apresentação de antígenos, o que resulta numa resposta imune com maior potência. [29]

As DCs podem também ser carregadas com células tumorais em estado de necrose ou apoptose, através de processos de fagocitose. As vantagens que decorrem da utilização de células tumorais em processo de morte celular são a independência de haplótipos de HLA, que resulta na aplicação da vacina a um espectro amplo de pacientes e na possibilidade de apresentação cruzada de um antígeno ou de um conjunto de antígenos específicos a epítomos do MHC de ambas as classes. [30]

No que respeita às células tumorais em apoptose, o estágio do processo de apoptose é fulcral para a resposta imune induzida pela vacina. As células tumorais em estágios mais avançados de apoptose potenciam a maturação de DCs e a imunidade adquirida por inoculação da vacina. O carregamento de DCs por fagocitose de células tumorais em necrose são igualmente eficientes, sendo que a capacidade de indução de imunidade antitumoral por DCs carregadas com células em necrose e a sua maturação encontra-se dependente da expressão de Hsp. [30]

Assim, as DCs que fagocitam células tumorais em estado de necrose ou apoptose são alvo de forte maturação, expressão de elevados níveis de moléculas pró-inflamatórias, como citocinas e quimiocinas e também moléculas co-estimulatórias, que induzem uma resposta imunológica eficaz após inoculação da vacina. [30]

O RNA mensageiro (mRNA) tumoral surge como uma estratégia alternativa de carregamento de antígenos em DCs, através da transfecção deste ácido nucleico proveniente de células tumorais e codificante de proteínas tumorais para o interior destas células. Em ambiente intracelular, ocorrerá a tradução do ácido ribonucleico (RNA) com posterior formação de proteínas características das células tumorais das quais o mRNA foi extraído, que sofrerão clivagem e formarão peptídeos. Estes peptídeos serão posteriormente integrados na superfície da DC, por ligação ao MHC. A utilização de mRNA é uma alternativa que apresenta

menores custos que a produção de proteínas ou vetores virais. Adicionalmente, o mRNA não é integrado no genoma humano, apresentando por isso maior segurança que o DNA. [30]

3.3.2. Processos de maturação de DCs

Os processos de maturação de DCs *in vitro* envolvem métodos como a eletroporação e a co-incubação, que se provou exequível e não tóxica em contexto de ensaio clínico, provocando respostas específicas por parte das células T para antígenos tumorais. [30]

Todavia, a co-incubação não se comprovou eficaz para mRNA codificante para antígenos tumorais. Este induziu uma resposta imune mínima em pacientes inoculados com a vacina, quando esta era composta por DCs sensibilizadas por co-incubação com mRNA codificante de antígenos. [30]

Por oposição, a eletroporação, pela sua capacidade de provocar aberturas momentâneas na membrana celular das DCs, facilita a translocação de antígenos para o seu interior, contribuindo para uma maior distribuição de antígenos nas DCs, quando em contacto com lisado tumoral ou mRNA codificante de antígenos específicos das células tumorais. Várias moléculas poderão ser adicionadas, com o intuito de maximizar o processo de maturação de DCs *in vitro*, como TNF- α , a prostaglandina E2, entre outras moléculas. [30]

Algumas vantagens resultantes da utilização da eletroporação são a baixa quantidade de tecido necessária para a transfecção dos antígenos, sendo uma técnica vantajosa em situações em que a disponibilidade de material tumoral é limitada. [30]

3.3.3. Aplicações

Num ensaio clínico de fase III (Linda M. Liau *et al.*, 2016) [31] de uma vacina com base em DCs como tratamento para o glioblastoma, o mais agressivo tumor cerebral, os pacientes foram agrupados de forma aleatória após a realização de cirurgia e após quimioterapia. O grupo de controlo recebeu somente temozolomida e placebo, enquanto um grupo de tratamento recebeu uma vacina autóloga com DCs, juntamente com temozolomida. Na vacina DC Vax-L, foram utilizadas DCs autólogas em que foi induzida ativação por contacto com lisados tumorais resultantes de excisão cirúrgica de células tumorais. A vacina, administrada por via intradérmica é especialmente favorável em doentes com metilação no gene da metiltransferase da DNA-O6-metilguanina (MGMT), levantando-se ainda a possibilidade de um possível efeito cooperativo, que advém da combinação entre a temozolomida administrada em

quimioterapia e a terapêutica imunitária resultante da ação da DC Vax-L. Os pacientes que participaram no ensaio tiveram um aumento do tempo médio de sobrevivência, ocorrendo uma mudança de 15-17 meses para 23,1 meses. Um subgrupo de pacientes sobreviveu em média 36 meses, sendo que apenas 2,1% registou efeitos adversos de grau III ou IV. [31]

Outra aplicação das vacinas antitumorais que recorrem a DCs, surgiu no contexto de cancro da próstata (Axel Heiser *et al.*, 2020), em que o antigénio específico da próstata (PSA) se encontra presente em células tumorais da camada epitelial da próstata, mas também em células benignas. A utilização de vacinas antitumorais surgiu, neste caso, através da transfecção de mRNA codificante para PSA em DCs autólogas, com o propósito de induzir a ativação de linfócitos T citotóxicos, com ação específica para PSA, num ambiente *in vitro*. Os linfócitos T citotóxicos não apresentam reatividade para compostos como a calicreína, que exibem uma estrutura semelhante ao PSA, demonstrando que o potencial para a ocorrência de problemas autoimunes não é significativo. Assim, os resultados deste estudo sugerem que as vacinas antitumorais com base em DCs, transfectadas com mRNA, de PSA são uma estratégia viável no combate a tumores na próstata, não se encontrando limitada à disponibilidade de PSA, e com possibilidade de minimizar o escape tumoral ao sistema imune. [32]

No âmbito de uma potencial aplicação como adjuvante no tratamento de cancro pancreático, foi estudada num ensaio clínico de fase I (Ryu Yanagisawa *et al.*, 2018) [33] a eficácia de DCs, quando pulsadas com o péptido de tumor de Wilms I (WT1), que é um antigénio frequentemente expresso nas células pancreáticas com atividade tumoral, e que se apresenta como um dos alvos da terapêutica imune para o cancro pancreático.

Algumas descobertas associadas à vacina com base em DCs pulsadas com WT-1 (WT1-DC) são bastante positivas, nomeadamente a especificidade para células que expressam WT1, o aumento da expressão de CD83 em DCs, a diminuição a nível do sangue periférico da razão entre neutrófilos e linfócitos e a manutenção da concentração de IL-6. A utilização de estratégias na área da imunoterapia contribui para a prevenção de uma potencial reincidência de tumores pancreáticos, em combinação com quimioterapia e após eliminação cirúrgica do tumor inicial. Neste contexto, foi demonstrada a segurança da vacina WT1-DC, registando-se apenas reações no local de administração, bem como alguns casos de febre. Em 7 de 8 pacientes testados comprovou-se que ocorreu a produção de linfócitos T citotóxicos, com especificidade para o antigénio WT1. Todavia, embora a produção de linfócitos T citotóxicos seja um bom indicador para o efeito imunoterapêutico da vacina, a eficácia da mesma não é garantida com base nestes dados. Uma resposta imune mais eficaz ocorreria por apresentação de uma maior quantidade de antigénios ao paciente. Mais estudos deverão ser

efetuados de forma a comprovar a ação e segurança da vacina WTI-DC, contudo, esta é uma opção interessante para a terapia adjuvante em casos de cancro do pâncreas cirurgicamente removido, como medida de prevenção de uma potencial reincidência do tumor. [33]

3.4. Vacinas de DNA e RNA (*DNA and RNA Vaccines*)

As vacinas baseadas na inoculação de ácidos nucleicos apresentam-se como uma alternativa viável na terapia imunológica de diferentes tipos de cancro, pela sua segurança, simplicidade e facilidade de fabrico. A administração destas vacinas poderá ocorrer *in vivo*, por inoculação direta no tecido do indivíduo, ou *ex vivo*, por transfecção de DNA ou RNA para APCs autólogas, posteriormente introduzidas no corpo do indivíduo. As vacinas baseadas em DCs são uma abordagem bastante utilizada em imunoterapia tumoral e um exemplo de administração *ex vivo*. Contudo, esta abordagem é complexa e dispendiosa, existindo ainda diferenças relevantes no processo de maturação de células DCs em laboratório e em contacto com o ambiente pró-inflamatório que caracteriza o corpo humano, pelo que a administração *in vivo* é desejável. A administração destas vacinas poderá, entre outras, ocorrer por via subcutânea, intramuscular, intravenosa, injeção intranodal e os veículos utilizados poderão recorrer a estratégias físico-químicas ou biológicas, para ultrapassar diferentes barreiras biológicas. [34]

As vacinas de DNA apresentam vários exemplares deste ácido nucleico que, após edição genética, codifica diversos antigénios tumorais, podendo ainda conter moléculas com capacidade de imunomodulação, com o objetivo de potenciar a ação da vacina. [34]

Estas vacinas atravessam a membrana plasmática da APC e migram até ao núcleo, no sentido de iniciar a transcrição da molécula de DNA e originar a molécula de mRNA codificante dos antigénios característicos das células tumorais. Seguidamente, o mRNA sofre tradução no citoplasma, o que resulta na geração destes antigénios tumorais específicos. Após tradução, as recém-formadas proteínas são degradadas em ambiente intracelular, por ação de proteossomas ou através de processamento no retículo endoplasmático, formando peptídeos que se ligarão ao MHC de classe I e serão apresentados a linfócitos naïve. [34]

Alternativamente, a degradação proteica dos antigénios tumorais pode ocorrer por via endossomal a nível extracelular, originando peptídeos que se ligarão ao MHC de classe II e serão apresentados pelas APCs a linfócitos B e T. A ativação destas células ocorre em órgãos linfáticos, nomeadamente no baço e em nódulos linfáticos. [34]

As vacinas que recorrem diretamente ao mRNA como molécula responsável pela distribuição da informação genética codificante de antígenos tumorais, são resultado de transcrição em ambiente *in vitro*, recorrendo a moléculas de DNA polimerase e moléculas de DNA codificantes destes mesmos antígenos.

O mRNA poderá ainda ser replicado por PCR, aumentando a quantidade de sequências codificantes, o que se traduz num aumento da resposta imune por parte do sistema imunitário do paciente. As vacinas com base em mRNA necessitam apenas de atravessar a membrana plasmática das APCs, pelo que a sua imunogenicidade é superior às vacinas com DNA. Todavia, a molécula de mRNA exhibe carga negativa, natureza hidrofílica e uma estrutura secundária ou terciária, denotando-se problemas na difusão intermembrana desta molécula e na sua distribuição por métodos químicos, nomeadamente na sua combinação com nanopartículas catiónicas, lípidos catiónicos ou outros biomateriais.

As vacinas de DNA são mais estáveis, apresentando maior tempo de semivida do que as vacinas de mRNA, dada a prevalência de RNAses em ambiente celular e as diferenças estruturais entre estas moléculas.

Algumas estratégias que contrariam estas dificuldades consistem na utilização de transportadores para moléculas de RNA, enriquecimento do seu conteúdo em nucleótidos de guanina e citosina e ainda a utilização de mRNA com uma conformação circular, por oposição a mRNA de estrutura linear. [34]

3.4.1. Respostas imunes desejáveis e indesejáveis

Apesar do principal objetivo das vacinas antitumorais consistir na obtenção de uma resposta imune direcionada para os antígenos tumorais, poderão ocorrer respostas imunes indesejadas quando existe um direcionamento do sistema imune para os próprios ácidos nucleicos. Este poderá resultar num decréscimo da potência da vacina e traduzir-se numa diminuição da síntese da proteína alvo.

As respostas imunes de natureza inata podem, porém, demonstrar-se positivas, por melhoria do efeito adjuvante da vacina, incremento da ativação de APCs e sua maturação, o que diminui a tolerância para os antígenos característicos das células tumorais. Possíveis respostas imunes de natureza inata sucedem por ligação dos ácidos nucleicos ao recetor tipo Toll 9 (TLR9), que resultam da existência de ilhas de pares de citosina-guanina (CpG) hipometilados no DNA e à estrutura transitória em dupla hélice do RNA. A ligação ao TLR9

promove a produção de interferões, nomeadamente interferões do tipo I, que, juntamente com IL-12, promovem a maturação de DCs. Adicionalmente, a estrutura do DNA, que se apresenta em dupla hélice, pode também funcionar como gatilho e induzir uma resposta imune de natureza inata, produzindo moléculas pró-inflamatórias. [34]

A ativação do sistema de imunidade inata poderá ter efeitos positivos ou negativos. A sua ativação excessiva inibe a expressão de antigénios tumorais e a tradução proteica a nível celular. Porém, a promoção de uma resposta imune de natureza inata poderá promover a maturação de APCs e a estimulação de linfócitos B e T. [34]

3.4.2. Segurança

Relativamente à segurança das vacinas que recorrem à utilização de ácidos nucleicos, o DNA e o mRNA apresentam-se como não-infecciosos. Contudo, existe alguma toxicidade associada a estas moléculas. Assim, as vacinas de DNA apresentam risco de mutagénese insercional, integração de plasmídeos no genoma humano e ainda presença de microrganismos contaminantes, que se deve ao moroso processo de fabrico e utilização de culturas de bactérias. [34]

As vacinas de mRNA exibem maior rapidez e não necessitam de culturas de bactérias para a sua síntese, o que aumenta a sua segurança comparativamente ao DNA. Porém, o mRNA é uma molécula com uma natureza pró-inflamatória mais prevalente que o DNA, o que se traduz em potencial para inflamação a nível local e sistémico, bem como um aumento de respostas autoimunes. A formulação, o método de distribuição, a via de administração e ainda a presença de nucleótidos modificados são fatores que influenciam a segurança destas vacinas, podendo reduzir a toxicidade e a atividade inflamatória da molécula de mRNA. [34]

A potencial toxicidade destas vacinas poderá advir ainda de nucleótidos modificados de natureza não nativa em moléculas de mRNA e também de componentes em sistemas de distribuição, que são utilizados em vacinas de DNA e mRNA. [34]

As vacinas baseadas em ácidos nucleicos utilizadas na área da imunoterapia tumoral estão em otimização constante, sendo que a sua efetividade é ainda incerta. Esta incerteza deve-se principalmente à incompreensão da biologia associada a células tumorais, bem como a dificuldade na identificação de antigénios, que permita a indução de uma resposta imune efetiva em diferentes tipos de cancro. Outra possível causa de insucesso destas vacinas está

relacionada com a geração de respostas inflamatórias e suscetibilidade a moléculas envolvidas no mecanismo de ação da vacina, como o interferão do tipo I. [34]

3.4.3. Vetores biológicos e não biológicos

A transfecção de material genético para vírus com propriedades oncolíticas é uma possibilidade para o transporte de material genético para o ambiente tumoral, com indução de uma resposta imune por parte do hospedeiro.

O vírus deverá ter determinadas características, como ausência de patogenicidade, especificidade para células tumorais, de forma intrínseca ou após manipulação. A seletividade poderá ocorrer a nível da entrada, por seleção de células que expressem antigénios tumorais, pela capacidade de indução de respostas retrovirais em ambiente intracelular e ainda pelo potencial de ação de fatores de restrição, determinantes para aferir a suscetibilidade da célula para transcrever e traduzir o material genético de origem viral.

A vasta diversidade de vírus com potencial utilização neste contexto compreende espécies como adenovírus, echovírus e mesmo o vírus do herpes simplex-I. Um exemplo relevante é o Rigvir, em que uma estirpe de riga vírus é utilizada no tratamento pós-cirúrgico de melanoma. O seu potencial de diminuição da recorrência do tumor em melanomas de grau inferior encontra-se aprovado para utilização na Letónia desde 2004, sendo o primeiro vírus a receber aprovação no âmbito da terapia antitumoral. Também o Oncorine, composto por uma estirpe de adenovírus geneticamente modificada, se encontra aprovado na China para utilização, em associação com quimioterapia, no tratamento de cancro na região do pescoço e da cabeça. Outro caso de sucesso, é o T-VEC, que foi aprovado nos Estados Unidos da América em 2015, através da FDA, no tratamento de metástases de melanoma. Posteriormente, na União Europeia, foi aprovado para o tratamento de melanoma cutâneo localizado em estágio avançado ou melanoma metastizado, composto por uma estirpe do vírus herpes simplex-I, geneticamente modificado. [35]

Adicionalmente, vetores como *Bifidobacterium* produzem proteínas semelhantes à endostatina, essencial para o controlo da angiogénese e um dos principais fatores para a progressão tumoral. Bactérias como *S.typhimurium* são também capazes de expressar moléculas imunes, que contrariam as características imunossupressoras do ambiente tumoral, como a interleucina-18 (IL-18) e a linfotóxina. Assim, as bactérias e vírus, enquanto vetores

para as moléculas de DNA, são também utilizados para a ativação da resposta imune em ambiente tumoral e diminuição da progressão do tumor. [35]

Os vetores não biológicos de natureza física ou química podem apresentar-se na forma de lípidos catiónicos ou de estruturas poliméricas policatiónicas, sendo que estas moléculas protegem o material genético de agressões por nucleases ou outros mecanismos de defesa celular. Estes vetores, apesar da sua segurança, são geralmente menos eficientes que os vetores biológicos em terapia tumoral. [35]

3.4.4. Aplicações

Uma potencial aplicação das vacinas de DNA é a sua utilização no tratamento de cancro da próstata. Em estudos pré-clínicos foi demonstrado que vacinas de DNA codificante da fosfatase ácida prostática (PAP) provocam uma resposta imune específica por parte de células T CD8+. Ensaio clínico (McNeel DG *et al.*, 2009) [36] posteriormente realizados em 22 pacientes com cancro da próstata em estágio D0, revelaram que 3 dos 22 pacientes desenvolveram células T CD8+ com especificidade para PAP e também IFN- γ e 9 dos 22 pacientes registaram uma proliferação de linhagens de células T CD8+ e CD4+ com especificidade para PAP. Ainda no âmbito do cancro da próstata, um ensaio clínico de fase I/II (Chudley L *et al.*, 2012) [37] demonstrou a eficácia de uma vacina de DNA codificante de um epítipo tumoral derivado do antígeno membranar específico da próstata (PSMA) fundido com um dos domínios da toxina do tétano, o fragmento C, demonstrando eficácia na ativação de anticorpos e células T CD4+. As células T CD8+ com especificidade para PSMA foram também encontradas após inoculação com vacinas de DNA.

As vacinas de DNA são também aplicáveis no âmbito do cancro cervical, uma vez que a sua etiologia se encontra relacionada com a infeção por papilomavírus. Antígenos como a oncoproteína 6 do Papiloma Vírus Humano (HPV E6) e oncoproteína 7 do Papiloma Vírus Humano (HPV E7) são apenas expressos em células cancerígenas, sendo que vacinas de DNA codificante destes antígenos se demonstram eficazes na indução de respostas imunes a nível celular e humoral em modelos animais. Um ensaio clínico de fase I (Trimble CL *et al.*, 2009) [38] recorreu a uma vacina de DNA que codifica uma versão do antígeno HPV E7, administrada através de injeção intramuscular, em pacientes em estágio II ou III de cancro cervical. A avaliação ocorreu na semana 15 do tratamento, em que se observaram regressões histológicas em 33% da população participante no ensaio.

No âmbito do cancro colorretal, as vacinas de DNA também têm potencial aplicação. No decorrer de um ensaio clínico de fase I (Staff C. *et al.*, 2011) [39], em que foi testada a eficácia de uma vacina de DNA codificante do antigénio carcinoembrionário humano (CEA), fundido com um epítopo modificado a partir da toxina tetânica direcionado para as células T CD4+ *helper*, foi demonstrada capacidade para induzir resposta imune em modelos animais. Assim, numa população de 10 pacientes, a vacina foi administrada após injeção intravenosa de ciclofosfamida. A vacina de DNA foi administrada por via intramuscular ou intradérmica, acompanhada de GM-CSF, e demonstrou efeitos adversos menores como mialgia no local de administração, fadiga, artralgia e cefaleias. Apenas um dos pacientes demonstrou reincidência do tumor numa avaliação posterior.

4. Estratégias alternativas e terapêuticas adjuvantes a vacinação tumoral

4.1. Vacinação com células cancerígenas estaminais

As células cancerígenas estaminais são um grupo de células pluripotentes encontrado em diferentes tipos de cancro, nomeadamente cancro da mama, pulmão, fígado, cérebro, gástrico, pancreático, entre outros. O seu comportamento é semelhante ao das células estaminais em tecidos normais, contudo, a capacidade de diferenciação em ambiente tumoral apresenta-se como promotora do crescimento tumoral e génese de novos tumores. Enquanto células estaminais, estes elementos tumorais mantêm uma capacidade de auto-renovação que os torna imortais. As propriedades estaminais que caracterizam este tipo de célula encontram-se restritas a uma fração do tumor, porém, a sua existência é determinante para a definição da diversidade celular e da heterogeneidade do tumor. [40]

Na sua generalidade, as células cancerígenas estaminais apresentam-se resistentes a terapias convencionais, como a radioterapia e a quimioterapia, o que indica que, apesar destas abordagens clínicas conduzirem à eliminação de uma proporção significativa de elementos tumorais, a população de células com capacidade ilimitada de diferenciação mantém a sua atividade promotora do desenvolvimento tumoral. De facto, o tratamento recorrendo a estas terapias demonstrou-se não só ineficaz, como também um fator no incremento da capacidade de auto-renovação em células não-estaminais. [40]

Assim, possíveis terapêuticas antitumorais que incidam na eliminação de elementos desta população de células cancerígenas poderão provar-se bem-sucedidas. Tais estratégias poderão passar pela utilização de inibidores específicos de antigénios característicos destas células, por exemplo CD44 ou CD133, ou de vias essenciais para o desenvolvimento de células

estaminais cancerígenas como a transição epidermo-mesenquimal, ou para o desenvolvimento do tumor, como a via JAK2/STAT3 e ainda PI3K/mTOR. Um anticorpo monoclonal com ação em células cancerígenas estaminais é o bevacizumab, que promove a regularização dos vasos sanguíneos tumorais, minimizando condições do ambiente tumoral que induzem a proliferação tumoral e inibindo o crescimento deste tipo de células tumorais. [40,41]

Opções adicionais que se poderão demonstrar eficazes serão a ativação de células NK, significativamente eficazes em populações de células cancerígenas presentes em glioma e ainda em carcinoma escamoso. Também vacinas antitumorais, recorrendo a DCs sensibilizadas para a apresentação de antígenos específicos, demonstram potencial como estratégia adjuvante a terapias convencionais.

Uma das barreiras à eliminação de células cancerígenas estaminais é o seu perfil antigénico, que se assemelha a células estaminais de tecidos normais e ainda a descoberta dos antígenos responsáveis por funções ou propriedades peculiares destas células tumorais, que permitam efetuar a distinção entre a população de células estaminais tumorais e não tumorais. [40,41]

4.2. Vacinação com neoantígenos

Os neoantígenos são moléculas de origem proteica não-autóloga, que resultam de mutações não sinónimas presentes no genoma de células tumorais, e possuem especificidade individual para o tecido tumoral, pelo que diferem dos TAAs. Estes antígenos possuem maior imunogenicidade em comparação com os TAAs e também uma maior afinidade para o MHC, não sendo alvo de tolerância imunológica como acontece com os restantes antígenos. [42]

A extensão da mutação de que resulta o neoantígeno encontra-se também diretamente relacionada com a sua imunogenicidade. Assim, se a molécula resultar de uma deleção, inserção ou ainda de uma mutação *frame-shift*, que correspondem a cerca de 5% das mutações somáticas, a sua imunogenicidade será maior por mudança acentuada da estrutura espacial da molécula e pela superior variação da sequência de aminoácidos. [42,43]

A eficácia terapêutica de uma vacina que recorra a TAAs encontra-se dependente da diferença na sua expressão entre células normais e tumorais. Contudo, no caso de uma vacina com neoantígenos a sua ação será direcionada para as células tumorais, reduzindo a probabilidade de ocorrência de respostas autoimunes. Com a progressão das técnicas de sequenciação genómica e o desenvolvimento de algoritmos de previsão de imunogenicidade,

a pesquisa e identificação de neoantígenos é cada vez mais promissora, o que contribui para a evolução da terapia personalizada no tratamento do cancro. [42]

A vacinação com neoantígenos é objeto de estudo em variados tipos de cancro, sendo que resultados promissores surgem no tratamento do melanoma. Diferentes estudos recorreram a algoritmos computacionais com o intuito de prever a afinidade de diferentes neoantígenos característicos de células tumorais de melanoma para o MHC de classe I, de forma a estabelecer uma lista de candidatos a inserir na vacina de acordo com a sua afinidade. [43-45]

Todavia, permanecem várias barreiras que impedem o tratamento de uma maior percentagem da população. O tempo de manufatura e o custo da vacina são elevados. Os algoritmos de previsão de afinidade para o MHC de classe I ou classe II necessitam também de desenvolvimento, de modo a garantir a eficácia da vacinação. É necessária mais investigação na identificação de biomarcadores, que apresentem informação viável acerca da resposta imune desencadeada pela vacina, o que permitiria a aferição da sua eficácia de forma sistemática. [43]

4.3. Outras terapias antitumorais

A imunoterapia antitumoral pode ser direcionada para moléculas-chave, que contribuem para o desenvolvimento do tumor, sua proliferação ou manutenção das condições específicas do ambiente tumoral. Entre a diversidade de estratégias terapêuticas direcionadas para estas moléculas, destacam-se os inibidores da transdução de sinal, a terapia com anticorpos e ainda os agentes modificadores de resposta biológica também conhecidos como estratégias de imunoterapia não-específicas. [46]

Os inibidores da transdução de sinal, assim como a imunoterapia não-específica, têm uma ação que se concentra na inibição de funções essenciais das células tumorais ou da integridade dos componentes intracelulares, utilizando moléculas de pequeno tamanho para induzir morte celular. Alguns exemplos de inibidores de transdução de sinal serão moléculas como axitinib e o crizotinib, que atuam como inibidores de tirosina-cinases, nomeadamente da família VEGFR, no caso do axitinib e, entre outras, a cinase anaplástica do linfoma (ALK) e também o fator do crescimento do hepatócito (HGFR), no que concerne ao crizotinib. No que respeita a imunoterapias não-específicas, o seu uso pode ocorrer como tratamento para o cancro em monoterapia ou como adjuvante com objetivo de estimular o sistema imunitário. Algumas moléculas utilizadas com este propósito são o Aldesleukin, uma forma recombinante da interleucina 2 (IL-2), que se encontra aprovada pela FDA para o tratamento de melanoma

metastizado e ainda o Dinileukin Diftitox, que se trata de uma proteína de fusão constituída por uma combinação entre fragmentos de IL-2 e provenientes da toxina da difteria, que permitem a ligação a recetores celulares específicos para IL-2, inibindo ainda assim a síntese proteica da célula tumoral. O Dinileukin Diftitox encontra-se aprovado pela FDA para o tratamento de linfoma cutâneo das células T. [46]

A terapia com anticorpos monoclonais tem como alvos recetores específicos, existentes à superfície das células de cancerígenas. Estes anticorpos poderão ter como alvos elementos do sistema imunitário, de modo a potenciar a resposta imune para células tumorais, provocar inibição ou alteração de vias de sinalização fulcrais para o desenvolvimento tumoral, por ligação a células responsáveis pela progressão do tumor. [46]

Alguns exemplos deste tipo de terapia incluem anticorpos como o cetuximab ou ainda o panitumumab, com especificidade para o recetor do fator do crescimento epidérmico. [47]

O cetuximab comprovou ser eficaz no tratamento de cancros do colon, cabeça, mama, renal, entre outros, por inibição da motilidade celular e metastização e por indução de apoptose em células tumorais que expressem EGFR. Este anticorpo encontra-se aprovado pela FDA para tratamento de carcinoma celular escamoso de cabeça e pescoço (SCCHN), em conjunto com radioterapia. O panitumumab é um anticorpo monoclonal de origem humana IgG2, que se encontra aprovado pela FDA para monoterapia de cancro colorretal ou em associação com regimes quimioterapêuticos com base na oxiplatina, em irinotecanos ou em fluoropirimidina. [46,47]

4.3.1 Anticorpos direcionados para moléculas de checkpoint imunológico

Uma característica de grande importância no sistema imunitário é sua capacidade para se impedir de atacar a si mesmo. As moléculas de checkpoint imunológico são utilizadas para este fim, necessitando de ser ativadas ou inativadas de forma a iniciar uma resposta imune. As células cancerígenas utilizam estas moléculas como modo de evitar o ataque por parte do sistema imunitário. As principais moléculas alvo de ação terapêutica são o CTLA-4 e também o antígeno de morte programada I (PDI), bem como o seu ligando PD-L1. [46]

Assim, CTLA-4 é um antígeno que se encontra expresso em células T, nomeadamente células T CD4+ e CD8+. Esta molécula atua na fase de apresentação de antígenos a células T através da migração para a superfície celular após a formação do complexo peptídeo-recetor, induzindo feedback inibitório, o que impedirá a ativação de células T. A molécula CTLA-4

encontra-se em competição com CD38, para os locais de ligação CD80, que existem a nível superficial nas células APC, provocando uma inibição da resposta imune. O ipilimumab é um anticorpo de origem humana que atua através do bloqueio de CTLA-4, encontrando-se aprovado pela FDA para utilização em melanoma. O tremelimumab é também utilizado como inibidor da CTLA-4, demonstrando eficácia no tratamento do cancro do pulmão celular não escamoso. [47,48]

A molécula PD-I é um antigénio existente em células T ativas, podendo também existir em outros elementos do sistema imune, como células NK e linfócitos B. É responsável pela inibição da resposta imune, através da ligação aos seus ligandos PD-L1 e PD-L2. O MDX-1106 é um anticorpo humano que apresenta uma ação bloqueadora da PD I, impedindo a ligação ao PD-L1 e induzindo, por consequência, apoptose em células do sistema imune. Este anticorpo demonstrou eficácia duradoura em indivíduos com diferentes tipos de cancro, como, por exemplo, melanoma, cancro colorretal e ainda cancro celular renal. [47,48]

5. Perspetivas Futuras

No passado recente ocorreu uma grande evolução da imunoterapia no tratamento de diferentes formas de cancro. As novas vacinas testadas apresentam maior eficácia, induzindo respostas imunes com maior especificidade, maior potência e menos efeitos adversos. Um dos aspetos chave deste desenvolvimento generalizado das vacinas antitumorais é a compreensão do valor de antigénios tumorais específicos (TSAs) relativamente a TAAs, pela especificidade que os primeiros conferem à resposta imune e pelo consequente decréscimo de efeitos adversos, que resulta na diminuição de resposta em tecidos não tumorais. A descoberta de TSAs, pela sua diversidade e também complexidade da metodologia associada à sua identificação, constitui ainda um obstáculo para o desenvolvimento de vacinas com elevado grau de especificidade. [49]

Pela sua elevada especificidade, as vacinas baseadas em neoantigénios apresentam-se como uma solução promissora para questões como a heterogeneidade do cancro e dificuldades na previsão de resposta à vacina por parte do paciente ou mesmo sequenciação do perfil antigénico das células tumorais. Contudo, mesmo estas vacinas necessitam ainda de aperfeiçoamento de índole tecnológica, com o objetivo de melhorar a precisão da capacidade preditiva da resposta desencadeada e distinguir neoantigénios de maior valia, e de acordo com a sua imunogenicidade. Esta melhoria poderá ocorrer por desenvolvimento de novos métodos tecnológicos ou síntese de moléculas que permitam distinguir antigénios de interesse. [49]

No que concerne à capacidade tumoral de escapar aos mecanismos de imunovigilância impostos pelo sistema imunitário, é necessário o desenvolvimento de novas combinações terapêuticas, nomeadamente com inibidores de recetores como a PD-1, PD-L1 e CTLA-4, que promovem este escape a respostas imunes induzidas pelas vacinas antitumorais.

A combinação com estratégias terapêuticas convencionais como cirurgia, radioterapia e ainda quimioterapia é uma alternativa que conduz a melhores resultados em pacientes com diferentes tipos de cancro. O foco deverá assim residir no aperfeiçoamento de vacinas seguras e personalizadas, e sua combinação com estratégias já existentes ou em desenvolvimento que incrementem a potência e eficácia da resposta imune. [49]

6. Bibliografía

1. ESPINOZA-SÁNCHEZ, N.A., GÖTTE, M. - **Role of cell surface proteoglycans in cancer immunotherapy**. *Semin Cancer Biol.* 62, (2020) 48-67.
2. CHIMAL-RAMÍREZ, G., ESPINOZA-SÁNCHEZ, N., FUENTES-PANANÁ, E. - **Protumor Activities of the Immune Response: Insights in the Mechanisms of Immunological Shift, Oncotraining, and Oncopromotion**. *Journal of oncology.* 2013, (2013) 835956.
3. HANAHAN, D., WEINBERG, ROBERT A. - **Hallmarks of Cancer: The Next Generation**. *Cell.* 144, 5 (2011) 646-674.
4. TAN, S., LI, D., ZHU, X. - **Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond**. *Biomed Pharmacother.* 124, (2020) 109821.
5. SANTOS-SIERRA, S. - **Developments in anticancer vaccination: budding new adjuvants**. *Biol Chem.* 401, 4 (2020) 435-446.
6. HIRATA, E., SAHAI, E. - **Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy**. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 7, 7 (2017).
7. HIDA, K., KAWAMOTO, T., OHGA, N., AKIYAMA, K., HIDA, Y., SHINDOH, M. - **Altered angiogenesis in the tumor microenvironment**. *Pathol Int.* 61, 11 (2011) 630-7.
8. KUROSU, T., OHGA, N., HIDA, Y., MAISHI, N., AKIYAMA, K., KAKUGUCHI, W., KUROSHIMA, T., KONDO, M., AKINO, T., TOTSUKA, Y., SHINDOH, M., HIGASHINO, F., HIDA, K. - **HuR keeps an angiogenic switch on by stabilising mRNA of VEGF and COX-2 in tumour endothelium**. *Br J Cancer.* 104, 5 (2011) 819-29.
9. MANTOVANI, A., ALLAVENA, P., SICA, A., BALKWILL, F. - **Cancer-related inflammation**. *Nature.* 454, 7203 (2008) 436-444.
10. MURDOCH, C., MUTHANA, M., COFFELT, S.B., LEWIS, C.E. - **The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis**. *Nat Rev Cancer.* 8, 8 (2008) 618-31.
11. SHANKARAN, V., IKEDA, H., BRUCE, A.T., WHITE, J.M., SWANSON, P.E., OLD, L.J., SCHREIBER, R.D. - **IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity**. *Nature.* 410, 6832 (2001) 1107-11.

12. O'DONNELL, J., TENG, M., SMYTH, M. - **Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy**. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 16, (2018) 1.
13. KEENAN, B.P., JAFFEE, E.M. - **Whole cell vaccines--past progress and future strategies**. *Semin Oncol*. 39, 3 (2012) 276-86.
14. CHIANG, C.L., BENENCIA, F., COUKOS, G. - **Whole tumor antigen vaccines**. *Semin Immunol*. 22, 3 (2010) 132-43.
15. GASTPAR, R., GEHRMANN, M., BAUSERO, M.A., ASEA, A., GROSS, C., SCHROEDER, J.A., MULTHOFF, G. - **Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells**. *Cancer Res*. 65, 12 (2005) 5238-47.
16. VEGA, V.L., RODRIGUEZ-SILVA, M., FREY, T., GEHRMANN, M., DIAZ, J.C., STEINEM, C., MULTHOFF, G., ARISPE, N., DE MAIO, A. - **Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages**. *J Immunol*. 180, 6 (2008) 4299-307.
17. OGI, C., ARUGA, A. - **Approaches to improve development methods for therapeutic cancer vaccines**. *Immunol Lett*. 164, 2 (2015) 100-8.
18. YU, X., DAI, Y., ZHAO, Y., QI, S., LIU, L., LU, L., LUO, Q., ZHANG, Z. - **Melittin-lipid nanoparticles target to lymph nodes and elicit a systemic anti-tumor immune response**. *Nat Commun*. 11, 1 (2020) 1110.
19. XUE, D., LIANG, Y., DUAN, S., HE, J., SU, J., ZHU, J., HU, N., LIU, J., ZHAO, Y., LU, X. - **Enhanced anti-tumor immunity against breast cancer induced by whole tumor cell vaccines genetically modified expressing alpha-Gal epitopes**. *Oncol Rep*. 36, 5 (2016) 2843-2851.
20. MACKIEWICZ, J., KARCZEWSKA-DZIONK, A., LACIAK, M., KAPCINSKA, M., WIZNEROWICZ, M., BURZYKOWSKI, T., ZAKOWSKA, M., ROSE-JOHN, S., MACKIEWICZ, A. - **Whole Cell Therapeutic Vaccine Modified With Hyper-IL6 for Combinational Treatment of Nonresected Advanced Melanoma**. *Medicine (Baltimore)*. 94, 21 (2015) e853.
21. SLINGLUFF, C. - **The Present and Future of Peptide Vaccines for Cancer**. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*. 17, (2011) 343-50.

22. LI, M., ZHAO, X., DAI, J., YU, Z. - **Peptide therapeutics and assemblies for cancer immunotherapy**. *Science China Materials*. 62, 11 (2019) 1759-1781.
23. MALONIS, R.J., LAI, J.R., VERGNOLLE, O. - **Peptide-Based Vaccines: Current Progress and Future Challenges**. *Chemical Reviews*. 120, 6 (2020) 3210-3229.
24. URBANI, F., FERRARESI, V., CAPONE, I., MACCHIA, I., PALERMO, B., NUZZO, C., TORSELLO, A., PEZZOTTI, P., GIANNARELLI, D., POZZI, A., SANTAQUILANI, M., ROAZZI, P., BASTUCCI, S., CATRICALÀ, C., MALFA, A., VERCILLO, G., GUALTIERI, N., BUCCIONE, C., CASTIELLO, L., PROIETTI, E. - **Clinical and Immunological Outcomes in High-Risk Resected Melanoma Patients Receiving Peptide-Based Vaccination and Interferon Alpha, With or Without Dacarbazine Preconditioning: A Phase II Study**. *Frontiers in Oncology*. 10, (2020).
25. BROWN, T.A., 2ND, MITTENDORF, E.A., HALE, D.F., MYERS, J.W., 3RD, PEACE, K.M., JACKSON, D.O., GREENE, J.M., VREELAND, T.J., CLIFTON, G.T., ARDAVANIS, A., LITTON, J.K., SHUMWAY, N.M., SYMANOWSKI, J., MURRAY, J.L., PONNIAH, S., ANASTASOPOULOU, E.A., PISTAMALTZIAN, N.F., BAXEVANIS, C.N., PEREZ, S.A., PAPAMICHAIL, M., PEOPLES, G.E. - **Prospective, randomized, single-blinded, multi-center phase II trial of two HER2 peptide vaccines, GP2 and AE37, in breast cancer patients to prevent recurrence**. *Breast Cancer Res Treat*. 181, 2 (2020) 391-401.
26. YASUDA, T., KAMIGAKI, T., NAKAMURA, T., IMANISHI, T., HAYASHI, S., KAWASAKI, K., TAKASE, S., AJIKI, T., KURODA, Y. - **Dendritic cell-tumor cell hybrids enhance the induction of cytotoxic T lymphocytes against murine colon cancer: a comparative analysis of antigen loading methods for the vaccination of immunotherapeutic dendritic cells**. *Oncol Rep*. 16, 6 (2006) 1317-24.
27. ZHANG, X., GORDON, J.R., XIANG, J. - **Advances in dendritic cell-based vaccine of cancer**. *Cancer Biother Radiopharm*. 17, 6 (2002) 601-19.
28. OSADA, T., NAGAOKA, K., TAKAHARA, M., YANG, X.Y., LIU, C.X., GUO, H., ROY CHOUDHURY, K., HOBEIKA, A., HARTMAN, Z., MORSE, M.A., LYERLY, H.K. - **Precision cancer immunotherapy: optimizing dendritic cell-based strategies to induce tumor antigen-specific T-cell responses against individual patient tumors**. *J Immunother*. 38, 4 (2015) 155-64.
29. GU, Y.-Z., ZHAO, X., SONG, X.-R. - **Ex vivo pulsed dendritic cell vaccination against cancer**. *Acta Pharmacologica Sinica*. 41, 7 (2020) 959-969.

30. NGUYEN-PHAM, T.N., LEE, Y.K., LEE, H.J., KIM, M.H., YANG, D.H., KIM, H.J., LEE, J.J. - **Cellular immunotherapy using dendritic cells against multiple myeloma**. Korean J Hematol. 47, 1 (2012) 17-27.
31. LIAU, L.M., ASHKAN, K., TRAN, D.D., CAMPION, J.L., TRUSHEIM, J.E., COBBS, C.S., HETH, J.A., SALACZ, M., TAYLOR, S., D'ANDRE, S.D., IWAMOTO, F.M., DROPCHO, E.J., MOSHEL, Y.A., WALTER, K.A., PILLAINAYAGAM, C.P., AIKEN, R., CHAUDHARY, R., GOLDLUST, S.A., BOTA, D.A., DUIC, P., GREWAL, J., ELINZANO, H., TOMS, S.A., LILLEHEI, K.O., MIKKELSEN, T., WALBERT, T., ABRAM, S.R., BRENNER, A.J., BREM, S., EWEND, M.G., KHAGI, S., PORTNOW, J., KIM, L.J., LOUDON, W.G., THOMPSON, R.C., AVIGAN, D.E., FINK, K.L., GEOFFROY, F.J., LINDHORST, S., LUTZKY, J., SLOAN, A.E., SCHACKERT, G., KREX, D., MEISEL, H.J., WU, J., DAVIS, R.P., DUMA, C., ETAME, A.B., MATHIEU, D., KESARI, S., PICCIONI, D., WESTPHAL, M., BASKIN, D.S., NEW, P.Z., LACROIX, M., MAY, S.A., PLUARD, T.J., TSE, V., GREEN, R.M., VILLANO, J.L., PEARLMAN, M., PETRECCA, K., SCHULDER, M., TAYLOR, L.P., MAIDA, A.E., PRINS, R.M., CLOUGHESY, T.F., MULHOLLAND, P., BOSCH, M.L. - **First results on survival from a large Phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma**. 16, 1 (2018) 142.
32. HEISER, A., DAHM, P., YANCEY, D.R., MAURICE, M.A., BOCZKOWSKI, D., NAIR, S.K., GILBOA, E., VIEWEG, J. - **Human dendritic cells transfected with RNA encoding prostate-specific antigen stimulate prostate-specific CTL responses in vitro**. J Immunol. 164, 10 (2000) 5508-14.
33. YANAGISAWA, R., KOIZUMI, T., KOYA, T., SANO, K., KOIDO, S., NAGAI, K., KOBAYASHI, M., OKAMOTO, M., SUGIYAMA, H., SHIMODAIRA, S. - **WT1-pulsed Dendritic Cell Vaccine Combined with Chemotherapy for Resected Pancreatic Cancer in a Phase I Study**. Anticancer Res. 38, 4 (2018) 2217-2225.
34. JAHANAFROOZ, Z., BARADARAN, B., MOSAFER, J., HASHEMZAEI, M., REZAEI, T., MOKHTARZADEH, A., HAMBLIN, M.R. - **Comparison of DNA and mRNA vaccines against cancer**. Drug Discovery Today. 25, 3 (2020) 552-560.
35. SHANMUGARAJ, B., PRIYA, L.B., MAHALAKSHMI, B., SUBBIAH, S., HU, R.-M., VELMURUGAN, B.K., BASKARAN, R. - **Bacterial and viral vectors as vaccine delivery vehicles for breast cancer therapy**. Life Sciences. 250, (2020) 117550.

36. MCNEEL, D.G., DUNPHY, E.J., DAVIES, J.G., FRYE, T.P., JOHNSON, L.E., STAAB, M.J., HORVATH, D.L., STRAUS, J., ALBERTI, D., MARNOCHA, R., LIU, G., EICKHOFF, J.C., WILDING, G. - ***Safety and Immunological Efficacy of a DNA Vaccine Encoding Prostatic Acid Phosphatase in Patients With Stage D0 Prostate Cancer***. Journal of Clinical Oncology. 27, 25 (2009) 4047-4054.
37. CHUDLEY, L., MCCANN, K., MANDER, A., TJELLE, T., CAMPOS-PEREZ, J., GODESETH, R., CREAK, A., DOBBYN, J., JOHNSON, B., BASS, P., HEATH, C., KERR, P., MATHIESEN, I., DEARNALEY, D., STEVENSON, F., OTTENSMEIER, C. - ***DNA fusion-gene vaccination in patients with prostate cancer induces high-frequency CD8(+) T-cell responses and increases PSA doubling time***. Cancer Immunology Immunotherapy. 61, 11 (2012) 2161-2170.
38. TRIMBLE, C.L., PENG, S., KOS, F., GRAVITT, P., VISCIDI, R., SUGAR, E., PARDOLL, D., WU, T.C. - ***A Phase I Trial of a Human Papillomavirus DNA Vaccine for HPV16+ Cervical Intraepithelial Neoplasia 2/3***. Clinical Cancer Research. 15, 1 (2009) 361-367.
39. STAFF, C., MOZAFFARI, F., HALLER, B.K., WAHREN, B., LILJEFORS, M. - ***A Phase I safety study of plasmid DNA immunization targeting carcinoembryonic antigen in colorectal cancer patients***. Vaccine. 29, 39 (2011) 6817-6822.
40. CHANG, J.C. - ***Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance***. Medicine (Baltimore). 95, 1 Suppl 1 (2016) S20-5.
41. TANIGUCHI, H., MORIYA, C., IGARASHI, H., SAITOH, A., YAMAMOTO, H., ADACHI, Y., IMAI, K. - ***Cancer stem cells in human gastrointestinal cancer***. Cancer Sci. 107, 11 (2016) 1556-1562.
42. PENG, M., MO, Y., WANG, Y., WU, P., ZHANG, Y., XIONG, F., GUO, C., WU, X., LI, Y., LI, X., LI, G., XIONG, W., ZENG, Z. - ***Neoantigen vaccine: an emerging tumor immunotherapy***. Mol Cancer. 18, 1 (2019) 128.
43. LI, L., GOEDEGEBUURE, S.P., GILLANDERS, W.E. - ***Preclinical and clinical development of neoantigen vaccines***. Annals of Oncology. 28, (2017) xii11-xii17.
44. OTT, P.A., HU, Z., KESKIN, D.B., SHUKLA, S.A., SUN, J., BOZYM, D.J., ZHANG, W., LUOMA, A., GIOBBIE-HURDER, A., PETER, L., CHEN, C., OLIVE, O., CARTER, T.A., LI, S., LIEB, D.J., EISENHAURE, T., GJINI, E., STEVENS, J., LANE, W.J., JAVERI, I., NELLAIAPPAN, K., SALAZAR, A.M., DALEY, H., SEAMAN, M., BUCHBINDER, E.I.,

- YOON, C.H., HARDEN, M., LENNON, N., GABRIEL, S., RODIG, S.J., BAROUCH, D.H., ASTER, J.C., GETZ, G., WUCHERPFENNIG, K., NEUBERG, D., RITZ, J., LANDER, E.S., FRITSCH, E.F., HACOEN, N., WU, C.J. - **An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma.** Nature. 547, 7662 (2017) 217-221.
45. SAHIN, U., DERHOVANESSIAN, E., MILLER, M., KLOKE, B.P., SIMON, P., LÖWER, M., BUKUR, V., TADMOR, A.D., LUXEMBURGER, U., SCHRÖRS, B., OMOKOKO, T., VORMEHR, M., ALBRECHT, C., PARUZYNSKI, A., KUHN, A.N., BUCK, J., HEESCH, S., SCHREEB, K.H., MÜLLER, F., ORTSEIFER, I., VOGLER, I., GODEHARDT, E., ATTIG, S., RAE, R., BREITKREUZ, A., TOLLIVER, C., SUCHAN, M., MARTIC, G., HOHBERGER, A., SORN, P., DIEKMANN, J., CIESLA, J., WAKSMANN, O., BRÜCK, A.K., WITT, M., ZILLGEN, M., ROTHERMEL, A., KASEMANN, B., LANGER, D., BOLTE, S., DIKEN, M., KREITER, S., NEMECEK, R., GEBHARDT, C., GRABBE, S., HÖLLER, C., UTIKAL, J., HUBER, C., LOQUAI, C., TÜRECI, Ö. - **Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer.** Nature. 547, 7662 (2017) 222-226.
46. GASSER, M., WAAGA-GASSER, A.M. - **Therapeutic Antibodies in Cancer Therapy.** Adv Exp Med Biol. 917, (2016) 95-120.
47. LYONS, T.G., KU, G.Y. - **Systemic therapy for esophagogastric cancer: targeted therapies.** Chin Clin Oncol. 6, 5 (2017) 48.
48. JAIN, P., JAIN, C., VELCHETI, V. - **Role of immune-checkpoint inhibitors in lung cancer.** Ther Adv Respir Dis. 12, (2018) 1753465817750075.
49. SONG, Q., ZHANG, C.D., WU, X.H. - **Therapeutic cancer vaccines: From initial findings to prospects.** Immunol Lett. 196, (2018) 11-21.