



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**A IMUNOTERAPIA E AS NOVAS PERSPETIVAS FUTURAS PARA  
O TRATAMENTO DO CANCRO ORAL**

Trabalho submetido por  
**Mariana de Loução Viana Quartel**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**setembro de 2018**





**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**A IMUNOTERAPIA E AS NOVAS PERSPETIVAS FUTURAS NO  
TRATAMENTO DO CANCRO ORAL**

Trabalho submetido por  
**Mariana de Loução Viana Quartel**  
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutora Guilhermina Moutinho**

e coorientado por  
**Prof. Doutor Carlos Zagalo**

**setembro de 2018**



## *Agradecimentos*

Quero agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Guilhermina Martins Moutinho, não só pela disponibilidade que cedeu, sem qualquer hesitação, para orientar esta tese como também por toda a ajuda e conselhos que permitiram a finalização deste trabalho.

Agradeço ao meu co-orientador, Professor Doutor Carlos Zagalo, pela oportunidade de ter mais uma ajuda e opinião que fizeram toda a diferença.

Agradeço aos meus pais, por me permitirem a realização deste curso e durante estes 5 anos fui sempre acompanhada pelo seu apoio incansável. A toda à minha família por estar sempre presente e pronta a aconselhar.

Ao meu namorado, pela companhia e motivação constante e pela presença nos momentos bons e maus em que a sua presença foi essencial.

Às minhas grandes amigas, Beatriz, Catarina, Tatiana e Ezaltina, companheiras de choradeiras e gargalhadas que eu espero nunca perder. E, à minha parceira de box pela sua presença do dia-a-dia e que irei sentir muita falta.

Por último, agradeço à casa Instituto Universitário Egas Moniz por me receber, ensinar e tornar uma pessoa melhor.



## ***Resumo***

A cavidade oral apresenta diversas funções, nomeadamente na mastigação, fonação, deglutição e sentido do gosto. Por vezes surgem situações de doença entre as quais o carcinoma da cavidade oral, que, pelas repercussões funcionais e estéticas, afeta a qualidade de vida do paciente. Anualmente em Portugal, registam-se cerca de 300 mortes causadas por esta patologia. O carcinoma espinocelular representa cerca de 90% de todas as neoplasias malignas da cavidade oral.

Embora já existam tratamentos como a cirurgia, radioterapia e quimioterapia, o prognóstico de pacientes com carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço em estadios avançados permanece com frequência insatisfatório devido à recorrência loco-regional destes tumores. Assim sendo, o estudo de novas alternativas para a resolução desta doença é de maior importância. A imunoterapia aparece, desta forma, como uma opção que, genericamente, tem menos efeitos secundários e conseqüentemente, menos morbidade que os tratamentos tradicionais. Permite ainda melhoria dos resultados clínicos com maior sobrevida e melhor qualidade de vida dos pacientes. Esta terapêutica tenta atuar diretamente sobre o foco da doença, nomeadamente sobre as células cancerígenas.

Muitos fármacos encontram-se ainda sobre investigação apesar de já se terem obtido resultados positivos com o uso de anticorpos monoclonais como o Cetuximab e outros.

**Palavras-Chave:** Imunoterapia; Cancro oral; Sistema Imunitário; Carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço.



## *Abstract*

The oral cavity has several functions, mainly in mastication, phonation, swallowing and sense of taste. Sometimes, disease situations arise such as carcinomas of the oral cavity, which, due to aesthetic and functional repercussions, affects the patient's life quality. In Portugal, there are about 300 deaths per year caused by cancer of the oral cavity. Squamous cell carcinoma accounts for about 90% of all malignancies in the oral cavity.

Although there are already treatments such as surgery, radiotherapy and chemotherapy, the prognosis of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck in advanced stadiums, remains with frequency unsatisfactory due to locoregional recurrence of these tumours. Thus, the study of new alternatives to this disease is of the utmost importance. Immunotherapy thus emerges as an option that, generically, has less side effects and consequently, less morbidity than the classics treatments. Also allows the improvement of clinical results with greater survival and better quality of patient's life. This treatment tries to act directly on the focus of the disease, particularly on cancer cells.

Many drugs are still under investigation, whilst they have already obtained positive results with the use of monoclonal antibodies such as Cetuximab and others.

**Keywords:** Immunotherapy; Oral Cancer; Immune System; Squamous cell Carcinoma.



# Índice Geral

|  |    |
|--|----|
| <b>1. Introdução</b> .....                               | 15 |
| <b>2. Cancro oral</b> .....                              | 17 |
| 2.1 O que é? .....                                       | 17 |
| 2.2 Carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço .....    | 20 |
| 2.3 Incidência, Prevalência e Sobrevida.....             | 22 |
| 2.4 Carcinogénese Oral.....                              | 24 |
| 2.5 Fatores de Risco.....                                | 27 |
| 2.5.1 Tabaco .....                                       | 27 |
| 2.5.2 Álcool .....                                       | 28 |
| 2.5.3 HPV .....  | 28 |
| 2.6 Sinais e Sintomas .....                              | 30 |
| 2.7 Tratamento .....                                     | 33 |
| 2.7.1 Cirurgia.....                                      | 35 |
| 2.7.2 Radioterapia.....                                  | 36 |
| 2.7.3 Quimioterapia .....                                | 37 |
| <b>3. O Sistema Imunitário</b> .....                     | 39 |
| 3.1 Aspectos gerais do sistema imunitário .....          | 39 |
| 3.2 O papel do sistema imunitário sobre os tumores ..... | 42 |
| 3.2.1 Tolerância imunológica .....                       | 44 |
| 3.2.2 Evasão ao sistema imunitário .....                 | 45 |
| 3.2.3 Perturbações da sinalização de células T.....      | 46 |
| <b>4. Imunoterapia</b> .....                             | 47 |
| 4.1 A Imunoterapia no Cancro.....                        | 47 |
| 4.2 Tipos de Imunoterapia .....                          | 51 |
| 4.2.1 Anticorpos monoclonais .....                       | 52 |
| 4.2.2 Citocinas .....                                    | 53 |
| 4.2.3 Inibidores do <i>Checkpoint</i> imunológico .....  | 54 |
| 4.2.4 Transferência celular adotiva.....                 | 55 |
| 4.2.5 Vacinas .....                                      | 57 |
| 4.2.6 Vírus oncolíticos.....                             | 59 |
| 4.3 Imunoterapia no Cancro Oral .....                    | 62 |
| 4.3.1 Anticorpos monoclonais .....                       | 62 |
| 4.3.2 Citocinas .....                                    | 66 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.3.3 | Inibidores do <i>Checkpoint</i> Imunológico .....     | 67 |
| 4.3.4 | Transferência Celular Adotiva.....                    | 70 |
| 4.3.5 | Vacinas .....   | 73 |
| 4.3.6 | Vírus oncolíticos.....                                | 76 |
| 4.4   | Considerações Futuras .....                           | 78 |
| 4.4.1 | Prevenção do cancro oral.....                         | 78 |
| 4.4.2 | A imunoterapia conjugada com outros tratamentos ..... | 78 |
| 4.4.3 | Particularidades da terapia imunológica.....          | 79 |
| 5.    | <b>Conclusões</b> .....                               | 81 |
| 6.    | <b>Bibliografia</b> .....                             | 83 |

## *Índice de Figuras*

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> - Carcinoma espinocelular do lábio .....   | 18 |
| <b>Figura 2</b> – Carcinoma espinocelular do bordo ventral da língua.....  | 19 |
| <b>Figura 3</b> – Progresso do carcinoma espinocelular oral em várias etapas .....   | 25 |
| <b>Figura 4</b> – As funções coordenadas do sistema imune inato e adaptativo para destruir as células cancerígenas .....     | 41 |
| <b>Figura 5</b> – Ilustração esquemática da vigilância imunológica.....  | 42 |
| <b>Figura 6</b> – Fuga imune em cada passo necessário para o desenvolvimento de uma forte imunidade anti-tumoral.....        | 44 |
| <b>Figura 7</b> – Diferentes abordagens de vacinas contra o cancro .....   | 58 |
| <b>Figura 8</b> – Um mecanismo pelo qual os vírus oncolíticos podem replicar-se seletivamente nas células cancerígenas ..... | 60 |
| <b>Figura 9</b> – Modificação genética dos linfócitos do sangue periférico.....  | 72 |



## *Índice de Tabelas*

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> - Classificação dos cancros orais por localização .....    | 18 |
| <b>Tabela 2</b> - Definição TNM do cancro oral.....                        | 34 |
| <b>Tabela 3</b> - Células e moléculas solúveis do sistema imunológico..... | 39 |
| <b>Tabela 4</b> - Mecanismos de escape imune no HNSCC .....                | 43 |
| <b>Tabela 5</b> - Espectro das imunoterapias disponíveis.....              | 51 |
| <b>Tabela 6</b> - Vantagens e desvantagens da ACT .....                    | 56 |
| <b>Tabela 7</b> - Vacinas testadas contra o cancro .....                   | 74 |



## ***Lista de Siglas***

**ACT:** Transferência celular adotiva (do inglês: *Adoptive cell transfer*)

**ADCC:** Citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (do inglês: *Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*)

**APC:** Células apresentadoras de antígenos (do inglês: *Antigen-Presenting Cells*)

**APM:** *Antigen processing and presenting machinery*

**BCG:** *Bacillus Calmette-Guerin*

**CAF:** Fibroblastos associados a tumores (do inglês: *Tumor associated-fibroblasts*)

**CAR:** Recetores de antígeno quiméricos (do inglês: *Chimeric antigen receptor*)

**CTL4:** Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (do inglês: *Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*)

**DC:** Células dendríticas (do inglês: *Dendritic cells*)

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico (do inglês: *Deoxyribonucleic acid*)

**EGF:** Fator de crescimento epidérmico (do inglês: *Epidermal growth factor*)

**EGFR:** Recetor do fator de crescimento epidérmico (do inglês: *Epidermal growth factor receptor*)

**EMT:** Transição mesenquimal epitelial (do inglês: *Epithelium mesenchymal transition*)

**FDA:** *Food and Drug Administration*

**HNC:** Cancro da cabeça e pescoço (do inglês: *Head and neck cancer*)

**HNSCC:** Carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço (do inglês: *Head and neck squamous cell carcinoma*)

**HPV:** Papiloma vírus humano (do inglês: *Human papilloma vírus*)

**IFN:** Interferão (do inglês: *Interferon*)

**IL:** Interleucina (do inglês: *Interleukin*)

**IL1RN:** *Interleukin 1 receptor antagonista*

**Imlygic:** *Talimogene laherparepvec*

**LAG-3:** Gene 3 de ativação de linfócitos (do inglês: *Lymphocyte activation gene 3*)

**mAB:** Anticorpos monoclonais (do inglês: *Monoclonal antibody*)

**MAL:** *Myelin and lymphocyte protein*

**MDSC:** Células supressoras derivadas de mieloides (do inglês: *Mieloyde derived supressor cells*)

**MHC:** Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês: *Major histocompatibility complex*)

**MMP1:** *Matrix metallopeptidase 1*

**NK:** *Natural killers*

**NSCLC:** Cancro do pulmão de células não-pequenas (Do inglês: *Non-small cell lung cancer*)

**PD-1:** Recetor da morte programada 1 (do inglês: *Programmed death receptor 1*)

**PD-L1:** Ligando do recetor de morte programada 1 (do inglês: *Programmed death ligand 1*)

**PMD:** Desordens potencialmente malignas (do inglês: *Potential malignant disorders*)

**SAT:** Tecido adiposo subcutâneo (do inglês: *Subcutaneous adipose tissue*)

**TA:** Antígenos tumorais (do inglês: *Tumor antigens*)

**TAA:** Antígenos associados a tumores (do inglês: *Tumor associated antigens*)

**TAM:** Macrófago associado a tumor (do inglês: *Tumor associated macrophage*)

**TCR:** Recetor das células T (do inglês: *T-cell receptor*)

**TGF- $\beta$ :** Fator de transformação de crescimento-beta (do inglês: *Transforming growth factor-beta*)

**TIGIT:** Domínio do motivo inibidor baseado na tirosina de células T (do inglês: *T cell tyrosine-based inhibitory motif domain*)

**TIL:** Linfócitos infiltrantes de tumor (do inglês: *Tumor infiltrating lymphocyte*)

**Tim-3:** Imunoglobulina mucina 3 de células T-3 (do inglês: *T cell immunoglobulin mucin- 3*)

**Treg:** Linfócito T regulador (do inglês: *Regulatory T cell*)

**TSA:** Antígenos tumorais específicos (do inglês: *Tumor specific antigens*)

**VEGF:** Fator de crescimento do endotélio vascular (do inglês: *Vascular endothelial growth factor*)

**WHO:** Organização Mundial de Saúde (do inglês: *World Health Organization*)

**5-FU:** *5-Fluorouracil*



## **1. Introdução**

A importância das doenças oncológicas como causa de morbidade e mortalidade é cada vez mais posta em causa, sendo reconhecido o seu impacto na sociedade e peso global pelos custos económicos e sociais envolvidos na sua prevenção, cura e reabilitação. As patologias oncológicas de cabeça e pescoço ocupam o 6º lugar entre os tumores malignos mais prevalentes a nível mundial, com milhares de novos casos diagnosticados anualmente por todo o mundo. Estes doentes oncológicos sofrem de deterioração das funções básicas que, quando detetadas, têm impacto negativo na sua qualidade de vida (Silveira *et al.*, 2012).

A identificação destas malignidades deve ser da responsabilidade do profissional de saúde oral, que sendo prestador de cuidados primários, tem o papel ideal para analisar e monitorar regularmente os tecidos moles da boca que apresentem alterações indicativas de malignidade oral ou lesões potencialmente malignas (Farah *et al.*, 2014).

Incluídos nas patologias oncológicas da cabeça e pescoço estão os cancrois orais, que são neoplasias agressivas, aparecem no lábio externo, cavidade oral e orofaringe, ocorrendo predominantemente entre os consumidores de tabaco e álcool. A maior parte dos cancrois orais é de origem epitelial, porém os carcinomas podem também surgir a partir de outros tecidos orais, incluindo as glândulas salivares (Farah *et al.*, 2014).

Os tratamentos padrão para o carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço (HNSCC), como cirurgia, quimioterapia e radioterapia, possuem um grau de eficácia e segurança terapêuticas relativamente alto. No entanto, o HNSCC é diagnosticado, na maioria dos casos num estadio avançado tendo um mau prognóstico. Logo, são urgentemente necessárias intervenções terapêuticas inovadoras (Ishii *et al.*, 2015).

O desenvolvimento do cancro da cabeça e pescoço (HNC) é fortemente influenciado pelo sistema imunológico do hospedeiro. Evidências recentes de pacientes com HNC que relatam a presença de defeitos funcionais e a apoptose de células T infiltrantes e circulantes, realçam o facto de que as suas respostas anti-tumorais estão comprometidas. Aparentemente, os tumores da cabeça e pescoço para além de efetivamente escaparem do sistema imune, também corrompem a resposta anti-tumoral do hospedeiro através de vários mecanismos distintos. São necessárias estratégias para um controlo mais eficaz da progressão do tumor e que restabeleçam a competência imunológica de pacientes com HNC para evitar a invasão tumoral (Whiteside, 2005).

Uma das vias terapêuticas mais interessantes recentemente pesquisadas é a imunoterapia, que se tornou possível graças aos avanços na compreensão do relacionamento entre os tumores e o sistema imune do hospedeiro, bem como devido ao progresso da tecnologia para identificar alvos terapêuticos moleculares.

Considerando o reconhecimento da disfunção do sistema imunológico no HNSCC, a imunoterapia é uma opção de tratamento que parece bastante viável, eventualmente pelos efeitos colaterais mais toleráveis e maior eficácia associada. Recentemente, foi desenvolvida a identificação de antígenos tumorais (TA) de HNSCC que permitiu o fornecimento de alvos para anticorpos monoclonais (mAb) e outros tipos de imunoterapia (Rapidis & Wolf, 2009).

## ***2. Cancro oral***

### **2.1 O que é?**

O cancro oral é um tipo de HNC no qual células malignas se formam nos lábios ou na cavidade oral, ou seja, estende-se desde as junções pele-vermelhão dos lábios anteriores até à junção dos palatos duro e mole superiormente e até à linha das papilas circunvaladas inferiormente e é dividido nas seguintes áreas específicas: lábio, 2/3 anteriores da língua, mucosa oral, pavimento da boca, palato duro e trígono retromolar (National Cancer Institute, 2017).

Cerca de 90% dos cancros que ocorrem na cavidade oral e na orofaringe, surgem nas células escamosas, células finas e planas que revestem os lábios e a cavidade oral, sendo denominados de carcinomas espinocelulares. O carcinoma espinocelular tem diferentes níveis de diferenciação e uma propensão para a metástase linfodonal (Rivera, 2015). Para além do carcinoma espinocelular outros tipos de tumores, como adenocarcinoma, carcinoma adenoide quístico e cancro mucoepidermóide também surgem nesta região (Schoenfeld, 2015).

O cancro oral é frequentemente detetado em fases tardias da sua evolução o que implica um mau prognóstico. A ausência de biomarcadores específicos da doença e alternativas terapêuticas dispendiosas são outros fatores que contribuem para os maus resultados clínicos. Sendo já conhecidos os fatores de risco e a história natural, esta doença é considerada evitável em muitos casos e existe a possibilidade de melhorar os seus fracos indicadores clínicos através da ação das ciências biomédicas e da medicina dentária.

Esta neoplasia é um problema urgente e relevante de saúde pública global e apesar do progresso na pesquisa e terapia do mesmo, a sobrevivência não sofreu melhorias significativas nos últimos anos, representando um desafio contínuo para a ciência biomédica.

Independentemente da acessibilidade da cavidade oral durante o exame clínico, o cancro oral geralmente é diagnosticado em fases avançadas. O diagnóstico e tratamento precoces continuam a ser a chave para melhorar a sobrevivência dos pacientes (Rivera, 2015).


Segundo estudos epidemiológicos, o termo “cancro oral” é por vezes empregado para evocar tanto o cancro de cavidade oral como cancro de orofaringe. No entanto, estas são


diferentes entidades clínicas e na prática de hoje em dia, frequentemente têm diferentes etiologias e são muitas vezes tratados de forma diferente (Huang & Sullivan, 2013).

O cancro oral é uma doença grave com risco de vida. Os médicos dentistas podem ser os primeiros a identificar/suspeitar destas lesões antes de as referenciarem a especialistas da área. Como o médico dentista provavelmente irá acompanhar a futura saúde oral do paciente, é importante que tenha uma compreensão básica dos vários procedimentos envolvidos no tratamento de patologia maligna da cavidade oral. Os dentistas terão sempre um papel importante no controlo de pacientes com cancro oral, com a responsabilidade de detetar lesões malignas precocemente, monitorar a saúde oral no pré e pós-operatório, avaliar a cicatrização e vigiar as recidivas a longo prazo (Deng *et al.*, 2011).

Tal como já referido, o cancro oral pode ser dividido por várias áreas, as quais podem ser classificadas com as seguintes características (Tabela 1):

Tabela 1 - Classificação dos cancros orais por localização (Adaptada de Foulkes, 2013)

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| <p><b><i>Cancro do lábio</i></b></p> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Cancros da pele não-melanoma mais comuns: carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular, estando o último representado na Figura 1;</li><li>• Mais comum em homens caucasianos e frequentemente relacionado com altos níveis de exposição à luz solar;</li><li>• Facilmente detetado e geralmente tratado com sucesso com cirurgia e/ou radioterapia. Tem o melhor prognóstico de todo o cancro oral.</li></ul>  <p>Figura 1 - Carcinoma espinocelular do lábio (Adaptada de Foulkes, 2013)</p> |
|--------------------------------------|---|

|  |   |
|--|---|
| <p><b><i>Cancro do pavimento da boca</i></b></p> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Comum em fumadores e usuários de tabaco não fumado;</li><li>• Geralmente é necessária uma grande cirurgia para garantir a excisão total, e os tumores apresentam alguma probabilidade de metastização para os nódulos cervicais.</li></ul>  |
| <p><b><i>Cancro da mucosa oral</i></b></p>       | <ul style="list-style-type: none"><li>• Mais comum na Ásia e na América do Sul, particularmente em indivíduos que usam tabaco betel ou não-fumado;</li><li>• No estadio inicial é caracterizado como sendo de menor dimensão e não invadir profundamente ou metastizar para os gânglios linfáticos locais, e é tratado apenas com cirurgia;</li><li>• Tumores mais avançados, caracterizados como tendo invadido profundamente e metastizado para os gânglios linfáticos locais, podem requerer cirurgia seguida de radioterapia e, às vezes, quimioterapia.</li></ul>  |
| <p><b><i>Cancro da língua</i></b></p>            | <ul style="list-style-type: none"><li>• É caracteristicamente um carcinoma das células escamosas, representado na Figura 2;</li><li>• Tratamento está dependente do estadiamento, com tumores maiores que requerem cirurgia de grande porte, seguidos por radioterapia e quimioterapia. Se os gânglios linfáticos também estiverem envolvidos, uma cirurgia mais extensa pode ser necessária para removê-los.</li></ul> <div data-bbox="552 1088 1291 1644" data-label="Image"></div> <p data-bbox="427 1653 1374 1727">Figura 2 – Carcinoma espinocelular do bordo ventral da língua (Adaptada de Foulkes, 2013)</p> |

## **2.2 Carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço**

O HNSCC é um grupo altamente heterogéneo de tumores que embora se desenvolva através de uma das duas principais vias carcinogénicas: (i) carcinogénese química através da exposição ao tabaco e álcool ou (ii) carcinogénese induzida por vírus, em ambos os casos está associado a uma falha fundamental da vigilância imunológica, onde as células tumorais escaparam ao reconhecimento e à lise pelos linfócitos T citotóxicos da imunidade adaptativa (Economopoulou *et al.*, 2015; Leapman *et al.*, 2013).

Uma das principais causas de doença e morte relacionadas com o cancro é o HNSCC, com mais de 600.000 novos casos diagnosticados anualmente por todo o mundo. Grande parte dos pacientes apresenta doença loco-regionalmente avançada e mais de 50% manifestam recidiva em 3 anos. Pacientes com HNSCC com progressão do cancro dentro de 6 meses após a quimioterapia à base de platina aplicada no contexto de doença primária/recorrente têm uma sobrevida média de 6 meses ou menos. A recorrência e metástase do HNSCC é facilitada pela evasão imunológica, que é mediada em parte pela expressão do recetor da morte programada 1 (PD-1) e dos seus ligandos (PD-L1 e PD-L2) (Ferris *et al.*, 2016).

Classicamente, este carcinoma é caracterizado como uma doença imunossupressora na medida em que possui um microambiente envolvido por um perfil desequilibrado de citocinas, onde as citocinas imunossupressoras são favorecidas sobre as estimuladoras. Os doentes demonstram contagens de linfócitos absolutos inferiores a indivíduos não afetados, linfócitos T citotóxicos com apoptose espontânea, performance enfraquecida das células natural killer (NK) e uma função deficiente de apresentação de antígenos (Ferris, 2015; Leapman *et al.*, 2013). O comprometimento dos linfócitos infiltrantes do tumor (TIL) também foi relatado em HNSCC e noutros tipos de cancro, com grande impacto no resultado clínico. Além disso, os linfócitos T reguladores (Treg) têm sido associados à progressão tumoral do HNSCC. Os Treg secretam citocinas supressoras como o fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) e interleucina 10 (IL-10), expressam também a proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) e correlacionam-se com a progressão tumoral (Ferris, 2015).

O tratamento dos HNC é um desafio por variadas razões, incluindo a diversidade de histologias e multiplicidade de comportamentos entre os cancros, bem como a complexidade anatómica da região da cabeça e pescoço (Schoenfeld, 2015). Pacientes

com HNSCC recorrente ou metastático após quimioterapia com platina têm um prognóstico muito pobre e opções terapêuticas limitadas (Ferris *et al.*, 2016).

Atualmente, vários biomarcadores potenciais para o HNSCC foram identificados, como os genes *interleukin 1 receptor antagonist* (IL1RN), *myelin and lymphocyte protein* (MAL) e *matrix metalloproteinase 1* (MMP1). Os biomarcadores são ferramentas oncológicas muito úteis por várias razões (Schutt *et al.*, 2012):

- I. Permitem a identificação precoce do cancro em exames diagnósticos;
- II. Podem ser utilizados como fatores prognósticos para direcionar e orientar decisões clínicas;
- III. Agem como ferramentas de monitoramento valiosas durante o acompanhamento dos pacientes (Schutt *et al.*, 2012).

Todavia, até ao momento, não foram desenvolvidas técnicas de biomarcadores e ensaios que satisfaçam os requisitos para uso clínico apropriado (Schutt *et al.*, 2012).

Estudos mais recentes mostram que níveis elevados de IL-8 e tecido adiposo subcutâneo (SAT) podem distinguir pacientes com HNSCC e pacientes saudáveis, com alta sensibilidade e especificidade (Rivera, 2015).

## **2.3 Incidência, Prevalência e Sobrevivência**

O HNC é considerado um dos seis tumores malignos mais prevalentes a nível mundial. Dentro das patologias oncológicas mais comuns da cabeça e pescoço, os tumores localizados na cavidade oral situam-se em décimo primeiro lugar no *ranking* dos tumores malignos mais comuns em todo o mundo e constituem cerca de 5% de todos os tumores malignos (Silveira *et al.*, 2012).

O cancro oral tem tendência a aparecer em indivíduos com idade superior a 50 anos e ocorre mais frequentemente na língua (bordo ventral-lateral, 40% dos casos), pavimento da boca (30% dos casos) e lábio inferior. Tem duas a três vezes mais prevalência em homens do que mulheres na maioria dos grupos étnicos (Rivera, 2015).

O baixo nível socioeconómico está associado a uma maior frequência de cancros orais e a taxas de sobrevivência mais reduzidas. A sobrevivência após um diagnóstico de cancro oral ou orofaríngeo permanece baixa, com cerca de 50% de indivíduos ainda vivos em cinco anos (Chan *et al.*, 2015).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO), as regiões que apresentam os números mais críticos a nível de incidência e mortalidade do cancro oral são a Ásia, particularmente o Sudeste, e a região da Europa. Especificamente por área, os países que são caracterizados por uma alta incidência de cancro oral são encontrados no sul e sudeste da Ásia (Sri Lanka, Índia, Paquistão e Taiwan), áreas do oeste da Europa (França) e Europa Oriental (Hungria, Eslováquia e Eslovénia), América Latina e Caraíbas (Brasil, Uruguai e Porto Rico) e regiões do Pacífico (Papua Nova Guiné e Melanésia) (Rivera, 2015).

Em Portugal, a patologia oncológica encontra-se em 2º lugar no *ranking* das causas de morte mais comuns no país. Comparando com os países da União Europeia, os tumores malignos da cavidade oral apresentam uma taxa de mortalidade relativamente baixa, contudo, com a presença sinérgica do álcool e tabaco o risco de morte torna-se maior quando equiparado à média da Comunidade Europeia (Silveira *et al.*, 2012).

Relativamente à cura, a maioria dos pacientes apresenta neoplasias precoces do lábio, que são altamente curáveis com taxas de cura de 90% a 100%. Não tão comum, pequenos cancros como no trígono retromolar, no palato duro e na gengiva da maxila possuem taxas de sobrevivência de até 100%. Pequenos cancros da zona anterior da língua, do pavimento da boca e da mucosa oral apresentam taxas de controlo local de até 90%. Todos estes valores são possíveis de alcançar com o tratamento de radioterapia ou cirurgia.

Os cancros moderadamente avançados e avançados do lábio também têm a possibilidade de ser controlados eficazmente por cirurgia ou radioterapia ou por uma combinação. Lesões moderadamente avançadas do trígono retromolar sem evidência de disseminação para gânglios linfáticos são frequentemente curáveis e têm mostrado taxas de controlo até 90%. No caso de estarem localizadas no palato duro, gengiva da maxila e mucosa oral têm uma taxa de controlo local de até 80%. Sem a presença de evidência clínica de disseminação para os gânglios linfáticos cervicais, lesões moderadamente avançadas do pavimento da boca e da zona anterior da língua são geralmente curáveis com taxas de sobrevida de até 70% e 65%, respetivamente (National Cancer Institute, 2017).

## **2.4 Carcinogénese Oral**

Resumidamente, o fenómeno da carcinogénese pode desenvolver-se espontaneamente, a partir de eventos como danos oxidativos, defeitos da ação de enzimas, como polimerases e recombinases, e, diminuição e reordenamento dos cromossomas. Assim como, pela presença de agentes carcinogénicos como o tabaco, álcool, dieta, higiene oral deficiente, refluxo gastro-esofágico e infeção viral que podem ser contribuintes relevantes no surgimento do HNSCC. Em ambos os casos, verifica-se a indução de alterações mutagénicas e não-mutagénicas ou epigenéticas nas células (INCA, 2008).

A carcinogénese é dividida em três etapas: iniciação, promoção e progressão. Fazem parte da sua origem processos como a ativação de genes, denominados de oncogenes (por exemplo o RAS) ou inativação de genes, conhecidos de genes supressores de tumores (como a mutação do gene p53), que permitem que uma única célula obtenha a vantagem de crescimento distinta (Charles *et al.*, 2015; Rhodus *et al.*, 2014).

Relativamente à carcinogénese oral, esta é um processo multifatorial altamente complexo que ocorre quando a exposição crónica de fatores de riscos sobre queratinócitos normais da mucosa oral quebra a homeostase e gera instabilidade genética que desencadeia várias alterações. A proliferação e o crescimento descontrolado, juntamente com uma descarga de bateria, conferem vantagens adaptativas às células vizinhas, que promovem a invasão local e orquestram a colaboração das células estromais circundantes com a secreção de vários fatores pelas células tumorais. Este microambiente promove perda de adesão celular (ex: E-caderina) e facilita a transição mesenquimal epitelial (EMT), onde a Vimentina e N-caderina podem ser expressas nestas células. As endotelinas podem contribuir para a sinalização parácrina pró-migratória entre fibroblastos associados a tumores (CAF) e células do cancro oral. Promovem também a proliferação e sobrevivência de células endoteliais CXCL1 e CXCL8. As células endoteliais produzem fatores como o fator de crescimento epidérmico (EGF), que aumentam a migração. Na Figura 3 encontram-se esquematizados estes conceitos (Rivera, 2015).

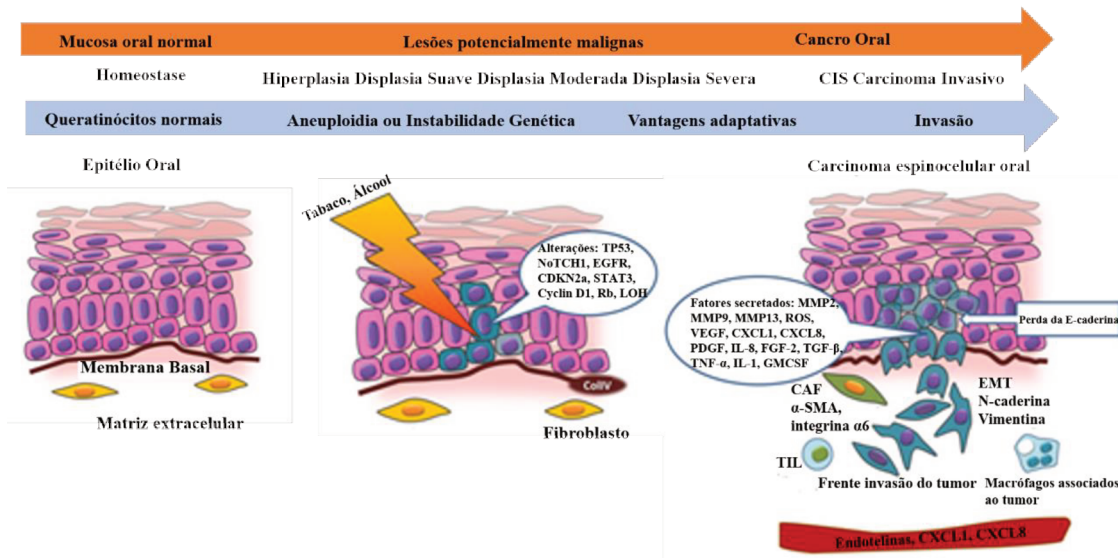


Figura 3 - Progresso do carcinoma espinocelular oral em várias etapas (Adaptada de Rivera, 2015)  
 NOTCH1: Notch homólogo 1, associado à translocação (*Drosophila*); EGFR: Recetor do fator de crescimento epidérmico; CDKN2A: Inibidor da quinase dependente de ciclina 2a; STAT3: Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3; Rb: Retinoblastoma; LOH: Perda de heterozigidade; MMP2: Matriz metaloproteínase 2; MMP13: Matriz metaloproteínase 13; ROS: Espécies reativas de oxigénio; TGF-β: Fator de crescimento transformador-β; VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular; TNF-α: Fator de necrose tumoral-α; CXCL1: Quimiocina [CXC motif] ligando 1; MMP9: Matriz metaloproteínase 9; IL-8: Interleucina 8; FGF-2: Fator de crescimento de fibroblastos 2; IL-1: Interleucina 1; CXCL8: Quimioquina [motivo CXC] ligando 8; PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas; GM-CSF: Fator estimulador de colónias de granulócito macrófago.

A carcinogénese requer múltiplos elementos essenciais: um potencial replicativo ilimitado, autossuficiência nos sinais de crescimento, falta de sensibilidade aos sinais anti-crescimento, a capacidade de escapar da apoptose, aumento da angiogénese, invasão e metastização (Rivera, 2015).

O consenso científico atual afirma que a carcinogénese oral ocorre de forma gradual marcado por uma acumulação de alterações genéticas suficientes para a transformação maligna. Tais mutações genéticas provocam mudanças na maturação normal de queratinócitos, afetando o controlo do ciclo celular, apoptose e diferenciação terminal (Rhodus et al., 2014). Consequentemente, os queratinócitos tornam-se instáveis, rodeados por um campo de pré-cancerização, que leva a alterações neoplásicas malignas, as quais podem ser herdadas nos seus clones. Posteriormente, pressões de seleção no microambiente da mucosa oral podem atuar sobre a população clonal heterógena, permitindo a perpetuação dessas células com melhores ferramentas e vantagens de adaptabilidade, sobrevivência e proliferação acima da normalidade das suas células vizinhas (Rivera, 2015).

Estas mudanças afetam a arquitetura epitelial, cuja histologia estratificada escamosa normal passa para displasia epitelial e, em seguida, para carcinoma espinocelular invasivo. O termo displasia epitelial é o resultado de um diagnóstico histopatológico onde

células com morfologia atípica são identificadas dentro do epitélio. As lesões displásicas são classificadas por gravidade como displasia leve, moderada, grave ou carcinoma *in situ*.

Nos tecidos epiteliais orais, as mutações acumuladas (isto é, a progressão genética), as lesões cromossômicas e a perda das funções de controlo celular são observadas durante o curso das alterações histológicas sequenciais, que culminam no cancro oral. Embora o processo carcinogénico possa ser agressivo (por exemplo, na presença de um genótipo deficiente de reparação de DNA ou transformação viral pelo papiloma vírus humano [HPV]), as alterações provocadas ocorrem durante um longo período, geralmente décadas.

A carcinogénese pode seguir múltiplos caminhos e ser multifocal. Nem todos os cancros num dado tecido e nem todas as células num determinado cancro podem abranger a mesma combinação de alterações genéticas e epigenéticas. A progressão para o cancro também pode ser influenciada por fatores específicos do ambiente do tecido do hospedeiro (Rhodus *et al.*, 2014).

Tumores que se desenvolvem em múltiplos locais na cavidade oral são referidos como cancerização em campo. Este fenómeno foi descrito na avaliação do epitélio displásico adjacente aos tumores invasivos no HNC, levando a um desenvolvimento aumentado de segundos tumores primários. Acreditava-se inicialmente que os tumores se desenvolviam a partir de células clonais independentes. Contudo, outros estudos também concluíram que esses clones estariam relacionados com tumores primários. Estes ninhos de células clonais multifocais podem ser consequentes da exposição prolongada a agentes carcinogénicos, tornando difícil o tratamento do HNSCC (Rhodus *et al.*, 2014).

A maioria dos carcinomas espinocelulares da cavidade oral desenvolvem-se em campos de epitélio pré-cancerizado que contêm queratinócitos em diferentes estadios de transformação. A persistência de tais campos pré-cancerizados, onde existiu anteriormente um carcinoma oral justifica a alta taxa de ocorrência de novos tumores. Além disso, indivíduos com carcinoma espinocelular oral aparentemente tratado com sucesso têm alto risco de desenvolver um novo carcinoma no, ou próximo ao local do tumor tratado. Este segundo carcinoma pode desenvolver-se por recorrência, isto é, a partir de queratinócitos malignos não removidos durante a cirurgia, ou a partir de um novo carcinoma, ou seja, queratinócitos transformados dentro do campo do epitélio pré-cancerizado do qual o carcinoma primário surgiu (Feller *et al.*, 2013).

## 2.5 Fatores de Risco

O cancro da boca é uma doença evitável, em que em 90% dos casos estão presentes os fatores de risco tabagismo e alcoolismo (Rivera, 2015). Em conjunto têm um efeito sinérgico que aumenta o risco de aparecimento do HNSCC (Bose *et al.*, 2013).

Entre outros fatores de risco, estão o HPV (principalmente associado ao carcinoma da orofaringe) e a radiação ultravioleta especialmente a UVB, que é considerado o fator de causa primária do cancro do lábio (Farah *et al.*, 2014; Rivera, 2015).

A nutrição também tem influência no cancro oral. Resultados de estudos científicos sugerem que uma dieta rica em frutas e vegetais reduz o risco de cancro oral devido à presença de vitaminas e moléculas antioxidantes e que uma dieta rica em tubérculos, vegetais, cereais e azeite também fornece um efeito protetor (Foulkes, 2013).

### 2.5.1 Tabaco

O tabaco é um fator de risco relevante para a maioria dos HNSCC e a carcinogénese induzida pelo tabaco é um fator causal estabelecido. Aproximadamente 80% dos HNSCC são resultado da exposição ao tabaco. A possibilidade de desenvolver cancro oral é 3 vezes maior em fumadores comparando com não fumadores (Bose *et al.*, 2013).

O fumo do cigarro prejudica a imunidade na cavidade oral, promovendo gengivite, periodontite e cancro oral. O fumo é constituído por diversos elementos que promovem o cancro e sucintamente podem ser separados em três grupos distintos: nitrosaminas, benzopirenos e aminas aromáticas. Estes químicos são designados de pré-carcinogénicos e sofrem alterações coordenadas por enzimas oxidativas. Para além da oxidação, o metabolismo enzimático ou não enzimático também pode produzir carcinogénios, como é o caso dos radicais livres, que devido à presença de eletrões desemparelhados, tornam-se bastante reativos e adquirem a capacidade de promover mutações por mecanismos complexos (Rivera, 2015).

Mais de 300 agentes cancerígenos foram identificados no fumo do tabaco, e muitos deles também se encontram presentes no tabaco sem ser de fumar, especificamente algumas nitrosaminas que são específicas ao tabaco. Estas substâncias foram detetadas em grandes quantidades na saliva de consumidores de tabaco (Foulkes, 2013).

A saúde pública, desde a segunda metade do século XX, tem implementado esforços significativos que reduziram a prevalência do uso de tabaco. Esta medida contribuiu para uma diminuição geral na incidência do HNSCC, principalmente nos países

desenvolvidos. Porém, o consumo do tabaco continua a ser um fator de risco importante e predominante para este carcinoma, afetando significativamente a incidência em países específicos (Bose *et al.*, 2013).

### **2.5.2 Álcool**

O consumo excessivo de álcool também é considerado um fator de risco independente e predominante para o HNSCC (Bose *et al.*, 2013).

O álcool pode atuar como um fator de risco local e sistémico: aumenta a permeabilidade da mucosa oral, dissolve os componentes lipídicos do epitélio, provoca atrofia epitelial e interfere na síntese e reparação do DNA. Além disso, tem efeitos tóxicos e mutagénicos, causando diminuição do fluxo salivar, afeta o sistema hepático diminuindo a capacidade do fígado de lidar com compostos tóxicos ou potencialmente carcinogénicos, e, podem surgir infeções e neoplasias derivadas do comprometimento da imunidade inata e adquirida que está associada ao consumo crónico do álcool (Rivera, 2015).

### **2.5.3 HPV**

Papiloma vírus são pequenos vírus de DNA sem envelope que infetam células epiteliais escamosas (Psyrrri & Dimaio, 2008).

Uma pequena fração de pessoas infetadas com HPV de alto risco tem tendência a desenvolver cancros, que geralmente surgem muitos anos após a infeção inicial. Com base em evidências epidemiológicas e moleculares, em 1995, a *International Agency for Research on Cancer* reconheceu que os tipos 16 e 18 de HPV eram carcinogénicos em humanos (Psyrrri & Dimaio, 2008).

A infeção persistente pelo HPV tipo 16 é um importante fator de risco para o desenvolvimento do HNSCC, em particular o carcinoma epidermóide de orofaringe (Andersen *et al.*, 2014).

As infeções por HPV de alto risco, para além de estarem associadas ao cancro do colo do útero, estão também aproximadamente a 70% dos HNSCC, sendo o HPV16 detetado em mais de 90% desses indivíduos (Skeate *et al.*, 2016).

Foi demonstrado que os pacientes com HNSCC com HPV+ têm melhor prognóstico do que pacientes HPV-, mas a razão para essa diferença não é clara (Schutt *et al.*, 2012). Estas malignidades são caracterizadas pela expressão das onco-proteínas E6 e E7 viral. A E6 promove a degradação do p53, ativa indiretamente a telomerase, e perturba a função

do supressor de tumor da fosfatase celular PTPN13, resultando num crescimento tumoral invasivo. A E7 inativa a pRb e ativa o Mi2beta, um componente do complexo histona deacetilase essencial para a transformação oncogénica (Bann *et al.*, 2016).

Existem mais de 200 tipos de estirpes de HPV, das quais mais de 15 tipos são classificados como sendo de alto risco. O HPV de alto risco tem maior probabilidade de evoluir para cancro (Turksma *et al.*, 2013).

Há uma forte associação entre a infeção oral por HPV e o carcinoma espinocelular oral entre os indivíduos com ou sem uso de tabaco ou álcool, sendo este também um fator de risco independente (Psyrrri & Dimaio, 2008).

Dados sugerem que a taxa de incidência de HPV na cavidade oral é maior em homens em comparação com mulheres (Bose *et al.*, 2013).

A incidência de cancro da orofaringe associado ao HPV está a subir para proporções epidémicas. Estes cancros têm um prognóstico mais favorável. Contudo, os efeitos colaterais graves podem persistir e causar morbidade significativa após o tratamento. Em contraste, os cancros associados ao tabaco e ao álcool têm um prognóstico muito mais prejudicial, onde aproximadamente 50% dos pacientes desenvolvem doença recorrente ou metastática (Schoenfeld, 2015).

## **2.6 Sinais e Sintomas**

Infelizmente, na maioria das situações, os pacientes são apenas diagnosticados após o desenvolvimento de sintomas característicos de fases mais avançadas da doença. O sintoma mais comum é o desconforto, levando o paciente a procurar cuidados médico-dentários, em cerca de 85% dos casos (Greenberg *et al.*, 2008).

Cancros orais e lesões orais pré-malignas podem ter apresentações clínicas variáveis. No caso do cancro oral avançado geralmente os sinais e sintomas são graves e exacerbados. Este tipo caracteriza-se por lesões grandes, exofíticas ou profundamente ulceradas, presença de endurecimento, sangram facilmente e metastizam para gânglios linfáticos regionais, o que está associado à linfadenopatia palpável. Pode ocorrer dor em cerca de 40% dos pacientes, geralmente apenas quando é alcançada uma dimensão clínica considerável. A dor pode ir de um desconforto leve a dores intensas em casos avançados. As dores mais intensas são sentidas na língua e podem também surgir devido à infiltração de estruturas mais profundas, incluindo nervos, músculos e até ossos. Outros sintomas frequentemente encontrados incluem, dificuldade na mastigação, deglutição e fala, otalgia, mobilidade dentária, dispneia, trismo muscular e parestesia (Junior *et al.*, 2013; Rhodus *et al.*, 2014).

Por outro lado, os carcinomas precoces e as lesões orais pré-malignas têm sinais mais subtis e muitas vezes não provocam nenhum sintoma detetável. A sua deteção precoce depende de um exame visual e tátil cuidadoso, no qual o clínico deve interpretar as características de um exame anormal, como cor, número e tamanho da lesão, topografia ou morfologia da lesão ou existência de endurecimento sugerindo infiltração submucosa (no caso de malignidade), para avaliar o risco de suspeita de lesões com potencial maligno (Rhodus *et al.*, 2014).

A aparência clínica do carcinoma espinocelular em casos avançados é bastante característica simplificando o seu diagnóstico, no entanto, inicialmente podem ser confundidos com outras lesões benignas levando a diagnósticos incorretos e atrasando o início do tratamento.

As lesões fundamentais clássicas encontradas são as úlceras e os nódulos firmemente aderidos aos tecidos subjacentes. Eventualmente os pacientes podem desenvolver linfadenopatia cervical sem qualquer outro sintoma. Em casos extremos podem surgir no paciente fístulas cutâneas, hemorragia, anemia intensa e perda de peso (Junior *et al.*, 2013).

O termo desordens potencialmente malignas (PMD) tem sido descrito como lesões epiteliais para os quais não há causa aparente e, por isso, deve ser submetida uma avaliação extra para despistar qualquer malignidade ou lesão pré-cancerígena (Rhodus *et al.*, 2014).

Os seguintes são diagnósticos clínicos ou sinais comuns de PMD do carcinoma oral (Junior *et al.*, 2013; Rhodus *et al.*, 2014):

- **Leucoplasia:** Manchas brancas de risco questionável excluindo outras doenças ou distúrbios conhecidos que não acarretam risco aumentado de cancro. A leucoplasia é muito mais comum em fumadores, consumidores de álcool e é considerado um fator de risco independente. Pode ser dividida em homogénea e não homogénea. A leucoplasia homogénea tende a ser lisa, uniformemente fina e consistente na brancura, normalmente com fissura superficial. Uma leucoplasia não homogénea tende a ter uma superfície com textura e tem espessura variável. A leucoplasia verrucosa proliferativa é um tipo de leucoplasia não homogénea que descreve pacientes com PMD multifocais e que apresentam resistência aos tratamentos propostos e alto risco de transformação maligna (Junior *et al.*, 2013; Rhodus *et al.*, 2014).

- **Eritroplasia:** É definida como uma mancha vermelha que não pode ser diagnosticada como outra lesão com risco aumentado de malignização, onde o tabaco e o álcool são considerados importantes fatores de risco, e em geral apresenta-se como uma lesão única. A sua prevalência é muito menor que a leucoplasia e com risco de malignização muito mais elevado (Junior *et al.*, 2013).

- **Eritroleucoplasia:** Mancha vermelha e branca que não pode ser caracterizada clinicamente como qualquer outra doença definível (Rhodus *et al.*, 2014).

- **Líquen plano:** Apesar de bastante controverso, é considerado pela maioria dos autores como uma PMD. Esta malignização pode ocorrer em todos os seus tipos clínicos, porém o tipo erosivo parece ser o mais relevante (Junior *et al.*, 2013).

- **Ulceração/Erosão:** Não pode ser caracterizada clinicamente como qualquer outra doença definida. A ulceração pode estar isolada ou parte de uma porção branca, vermelha ou misto vermelho/branco (Rhodus *et al.*, 2014).

- **Endurecimento:** Firmeza ou dureza da mucosa causada por infiltração submucosa de um carcinoma (Rhodus *et al.*, 2014).

- **Fixação:** Invasão do carcinoma em tecidos profundos (Rhodus *et al.*, 2014).

- **Cronicidade/Persistência:** Falha na cura das lesões. O cancro não é uma doença espontaneamente reversível, portanto, uma lesão maligna normalmente não desaparece na ausência de terapia anti-tumoral definitiva (Rhodus *et al.*, 2014).

- **Linfoadenopatia:** Aumento dos gânglios linfáticos regionais causado por disseminação metastática de células neoplásicas através de vasos linfáticos. Os nódulos são geralmente indolores e muitas vezes tornam-se fixos devido à erosão capsular e à infiltração local. Os tumores que envolvem endurecimento, fixação e linfoadenopatia acentuada são sinais de cancro avançado (Rhodus *et al.*, 2014).

É fundamental que os clínicos não se esqueçam que se a impressão clínica de uma lesão for benigna e por isso tratada empiricamente, devem acompanhar o paciente até à resolução dessa mesma lesão. Tipicamente, nos estadios iniciais, os carcinomas orais podem parecer pequenas, inócuas e inofensivas alterações nas mucosas, às quais o clínico pode não achar necessário responder agressivamente. Um período prolongado para além de 2 a 3 semanas de observação e tratamentos empíricos podem permitir que a lesão se expanda e potencialmente metastize (Rhodus *et al.*, 2014).

## 2.7 Tratamento

O HNSCC é normalmente tratado por um ou uma combinação de vários tratamentos. A escolha de um ou outro depende não só da localização, tamanho e estadio do tumor primário, como também das comorbidades apresentadas pelo paciente, estado nutricional, a capacidade de tolerar o tratamento e os desejos do paciente de enfrentar a terapia (Rivera, 2015). A probabilidade do controlo da doença, os resultados funcionais e cosméticos esperados, a ressecabilidade do tumor e a disponibilidade de recursos e conhecimentos especializados são outros aspetos a ter em conta (Huang & Sullivan, 2013).

Tal como os outros tumores da cabeça e pescoço, a terapia dos pacientes com cancro oral requer uma abordagem multidisciplinar pois o tratamento pode estar associado a dificuldades encontradas em diferentes funções como comer, beber, falar e respirar. Além de que, o tratamento pode criar alterações físicas e funcionais no corpo, o que pode despoletar distúrbios como a depressão, especialmente em pacientes com outros problemas psicológicos (Foulkes, 2013).

Abordagens de tratamento para o cancro da cavidade oral incluem procedimentos únicos como cirurgia, radioterapia (radioterapia por feixe externo [EBRT] e/ou braquiterapia), bem como terapia sistémica adjuvante (quimioterapia e/ou agentes alvo). Várias combinações dessas modalidades também podem ser usadas conforme a apresentação da doença e dos achados patológicos (Huang & Sullivan, 2013)

A categorização do estadio em que o cancro oral se encontra é decisivo para escolher o tratamento mais adequado. Esse é o intuito da classificação TNM, representada na Tabela 2, em que o T significa “extensão tumoral”, o N “estado dos gânglios linfáticos” e o M “presença ou ausência de metástases à distância” (Moura *et al.*, 2006). Os estadios iniciais do cancro oral (I e II) podem ser tratados com cirurgia e radioterapia de forma isolada e os estádios mais avançados (III e IV) são tratados em geral de forma combinada, radioterapia após a cirurgia (Tsantoulis *et al.*, 2007).

Tabela 2 - Definição TNM do cancro oral (Tsantoulis *et al.*, 2007)

| <b><i>Extensão Tumoral (T)</i></b>  |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tx Não pode ser avaliado</li> <li>• T0 Sem evidência de tumor primário</li> <li>• Tis Carcinoma <i>in situ</i> (CIS)</li> <li>• T1 Tumor com <math>\leq 2</math>cm</li> <li>• T2 Tumor com 2-4cm</li> <li>• T3 Tumor com <math>&gt; 4</math>cm</li> <li>• T4a Doença local moderadamente avançada. Lábio: O tumor invade o osso cortical, o nervo alveolar inferior, o pavimento da boca ou a pele (queixo e nariz). Cavidade oral: o tumor invade através do osso cortical, até ao músculo/extrínseco da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seio maxilar e pelo do rosto.</li> <li>• T4b Doença local muito avançada. Lábio e cavidade oral: O tumor invade o espaço mastigador, placas pterigóides ou a base do crânio; ou envolve a carótida interna.</li> </ul> |
| <b><i>Estado dos gânglios linfáticos (N)</i></b>  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nx Não pode ser avaliado</li> <li>• N0 Sem evidência de metástase</li> <li>• N1 Metástase num único gânglio linfático ipsilateral; <math>\leq 3</math>cm de dimensão</li> <li>• N2a Metástase num único gânglio linfático ipsilateral; 3-6cm de dimensão</li> <li>• N2b Metástase em múltiplos gânglios linfáticos ipsilaterais; <math>\leq 6</math>cm de dimensão</li> <li>• N2c Metástase em gânglios bilaterais ou contralaterais; <math>\leq 6</math>cm de dimensão</li> <li>• N3 Metástase em gânglio linfático com <math>&gt; 6</math>cm de dimensão</li> </ul>  |
| <b><i>Metástase à distância (M)</i></b>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mx Não pode ser avaliado</li> <li>• M0 Sem evidência de metástase</li> </ul>   |
| <b><i>Estadio clínico (T+N+M)</i></b>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0 Tis N0 M0</li> <li>• I T1 N0 M0</li> <li>• II T2 M0 N0</li> <li>• III T3 (basta sozinho), T2 ou T1 N1 M0</li> <li>• IV A T4a N0 ou N1 M0<br/>T1, T2 ou T3 N2 M0</li> <li>• IV B qualquer T N3 M0<br/>T4b qualquer N M0</li> <li>• IV C qualquer T qualquer N M1</li> </ul>   |

Aproximadamente um terço dos pacientes com HNSCC são diagnosticados na fase I/II da doença. Um bom prognóstico para esses pacientes, com taxas de cura de 80% (estadio I) e 65% (estadio II) é espectável (Rivera, 2015).

Infelizmente, a maioria dos casos de HNSCC são diagnosticados em estadios avançados da doença (III ou IV), com sobrevida em 5 anos menor que 50% e uma cura de 30%. Pacientes com doença metastática, que não são tratados, mostram uma sobrevida de cerca de 4 meses (Rivera, 2015). Além disso, apesar das estratégias de tratamento convencionais como a cirurgia, radioterapia e/ou a quimioterapia terem sofrido melhorias, estes pacientes têm um prognóstico que permanece maioritariamente insatisfatório devido à recorrência loco-regional da cabeça e pescoço (Matta & Ralhan, 2009).

Embora grandes esforços tenham sido feitos para aperfeiçoar as modalidades dos tratamentos tradicionais do HNSCC muitas questões persistem. Aumentos limitados nos tempos de sobrevida ocorreram na última década e os tratamentos atuais têm efeitos colaterais graves. A cirurgia e a radioterapia podem deixar os pacientes desfigurados e sem capacidade de uso das funções complexas da cabeça e pescoço. A quimioterapia pode ser devastadora para o paciente, resultando em danos graves e disfunções nos órgãos internos. As platinas, em particular, estão relacionadas com a neuropatia, nefrotoxicidade, perda auditiva, náuseas e vômitos. Estes malefícios são inaceitáveis para alguns pacientes e limita o seu uso. E, embora o avanço da quimiorradioterapia tenha levado a grandes aumentos no controlo local e regional, houve pouca melhoria no controlo metastático (Schutt *et al.*, 2012).

### **2.7.1 Cirurgia**

Atualmente, pretende-se fazer a excisão de tumores com cirurgias menos invasivas preservando o máximo possível a estrutura normal da cavidade oral assim como a sua função. A cirurgia por sua vez, fornece uma maior hipótese de cura para grande parte dos pacientes, principalmente para aqueles em que o cancro não afetou outras áreas do organismo (Hartmann & Grandis, 2016).

A principal técnica de tratamento para a maioria dos cancros orais é a cirurgia, que é com regularidade a única opção de cura na doença avançada. O objetivo principal é extirpar o tumor, com uma boa margem, ou seja, remoção de uma porção de tecido intacto em redor do tumor de forma a diminuir o risco de disseminação localizada, para a prevenção da recorrência e também remover quaisquer gânglios linfáticos que sejam suscetíveis ou estejam afetados pelo cancro. A redução da função precisa de ser

minimizada, e existem vários métodos que podem auxiliar. A cirurgia de *Mohs* permite que o dano no lábio seja mínimo e promove a preservação da função. O uso de enxertos e retalhos pode ser aplicado em casos onde tumores da língua e pavimento da boca foram extirpados e onde houver um déficit considerável de espaço causado pela remoção extra das margens para evitar a recorrência. Por último, se existe confirmação ou suspeita de cancro nos gânglios linfáticos no pescoço, é necessária a remoção dos mesmo com prévia dissecação do pescoço (Foulkes, 2013).

Com a inclusão de radioterapia e quimioterapia como adjuvantes na técnica cirúrgica, a cirurgia como modalidade de tratamento única já não é considerada a escolha ideal para a maioria dos cancros orais, devido aos seus resultados de tratamento mais fracos (Deng *et al.*, 2011).

### **2.7.2 Radioterapia**

A radioterapia é a especialidade que aplica radiações ionizantes durante o tratamento de tumores. Este tipo de terapêutica está indicado em tumores da cavidade oral no estadio inicial e os seus resultados obtidos sobrepõem-se aos do tratamento cirúrgico, tal como nos tumores em estadios avançados irressecáveis, ou como terapia na preservação do órgão (Langendijk *et al.*, 2003).

A transmissão de radiação a tumores pode ser repartida em dois grandes grupos: terapia por radiação interna e terapia por radiação externa. Em qualquer tipo de radioterapia escolhido, deverá existir um planeamento cuidadoso de modo a minimizar os perigos associados à terapêutica (Sadeghi *et al.*, 2010).

Em pacientes com cancro oral é comum receberem radioterapia, a qual destrói as células cancerígenas, interrompendo o método de replicação do DNA celular. Contudo, os tecidos benignos podem tornar-se inflamados e avermelhados, potenciando a sua necrose. As seguintes formas de radioterapia são geralmente usadas no tratamento de cancros orais e esta pode ser administrada como terapia única como também concomitante com outras terapias (Foulkes, 2013):

- **Tratamento primário:** A radioterapia pode por vezes ser administrada a partir de implantes radioativos (braquiterapia) em pequenos tumores em substituição da comumente usada radioterapia externa/cirurgia (Foulkes, 2013);

- **Tratamento neoadjuvante:** A radiação pretende reduzir o tamanho do tumor antes da cirurgia (Foulkes, 2013);

- **Tratamento pós-cirúrgico:** Proporciona o controlo de tecido cancerígeno microscópico que pode ter resistido e sobrevivido ou em zonas onde a cirurgia estaria dificultada (Foulkes, 2013);

- **Tratamento paliativo:** A radioterapia permite o controlo do sangramento, redução da dor e oferece controlo temporário do crescimento do tumor em cancros incuráveis (Foulkes, 2013).

Para o cancro da cavidade oral ressecável, a base do tratamento é a cirurgia, embora os mesmos praticantes possam advogar o uso da radioterapia isoladamente em determinadas apresentações “precoces” da doença ou combinadas com quimioterapia na doença num estadio mais avançado localmente. De uma forma geral, a última opção é mais comumente reservada para casos em que a cirurgia pode ser problemática. Assim, a radioterapia primária ± quimioterapia é geralmente reservada para pacientes incapazes de tolerar ou que são inadequados para a cirurgia. Por outro lado, a braquiterapia pode ser considerada como uma modalidade única para o pequeno tumor primário precoce. Ou, pode também ter um papel como adjuvante à cirurgia no contexto de margens de ressecção inadequadas, avaliadas patologicamente, assim como a radioterapia pós-operatória por radioterapia externa ± quimioterapia, que geralmente é reservada para aqueles tumores com características patológicas desfavoráveis. A braquiterapia também pode ser especialmente útil na re-irradiação para doença persistente ou recorrente ou para um segundo tumor primário que surge dentro de um campo de radiação anterior (Huang & Sullivan, 2013).

### 2.7.3 Quimioterapia

A quimioterapia baseia-se na utilização de fármacos classificados como agentes quimioterapêuticos e a sua escolha depende do tipo de cancro que se pretende tratar. Assim, a quimioterapia tem como objetivo induzir uma toxicidade específica sobre as células neoplásicas e pode atuar de várias formas: pode por si só levar à morte de células cancerígenas, reduzir o risco de metastização, tornar as células malignas mais sensíveis à radioterapia e reduzir a dimensão de qualquer cancro antes de uma eventual cirurgia. Para que um fármaco seja capaz de destruir todas as células neoplásicas, estas devem ser expostas a uma dose suficiente de fármaco para esse efeito, durante um determinado período de tempo (Pignon *et al.*, 2009; Wong, 2014).

Os agentes quimioterapêuticos, que podem ser únicos ou múltiplos, ao serem de natureza citostática ou citotóxica, evitam a reprodução rápida de células malignas. Ao

contrário da cirurgia e radioterapia, a quimioterapia é capaz de alcançar o cancro metastático, não sendo limitada a regiões exclusivas do organismo (Wong, 2014).

A quimioterapia pode ser usada como tratamento adjuvante (após a cirurgia), neoadjuvante (antes da cirurgia para facilitar a cirurgia) ou paliativamente (para reduzir os sintomas) (Foulkes, 2013).

A aplicação de quimioterapia tem mostrado ser eficaz quando combinada com cirurgia e radioterapia. Estudos científicos concluíram que a quimioterapia e a radioterapia após a cirurgia melhoram as taxas de sobrevivência em 16%. Quando a cirurgia não é possível, a quimioterapia e a radioterapia mostraram uma melhoria de 22% nas taxas de sobrevida quando comparado com a radioterapia isolada. Os fármacos geralmente mais usados são a cisplatina, carboplatina, 5-fluorouracil (5-FU) e bleomicina, tipicamente usados em combinações de dois (Foulkes, 2013).

### 3. O Sistema Imunitário

#### 3.1 Aspectos gerais do sistema imunitário

O sistema imunitário é constituído por uma intrincada rede de órgãos, células especializadas e moléculas, e tem por finalidade manter a homeostase do organismo, combatendo por norma as agressões externas e internas. Deste sistema fazem parte células e órgãos imunes que sintetizam substâncias que circulam pelo corpo para a proteção contra microrganismos que causam infeções e outras patologias. Desta forma, pode ajudar na proteção contra o cancro (American Cancer Society, 2016; Cruvinel *et al.*, 2010).

Todas as substâncias normalmente encontradas no organismo são acompanhadas pelo sistema imunológico. E, qualquer substância nova que o sistema imunológico não reconheça “dispara um alarme”, levando a um ataque por parte do sistema imune. No caso dos microrganismos, estes contêm elementos como certas proteínas que não são encontradas geralmente no corpo humano, que os identifica como substâncias estranhas ao organismo. A resposta imune pode não só destruir microrganismos como também células cancerígenas. No entanto, existe uma maior dificuldade na deteção das células neoplásicas uma vez que o cancro surge quando as células do próprio organismo sofrem alterações e começam a ficar fora de controlo (American Cancer Society, 2016).

A função imunológica tem sido conceitualmente dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa onde cada uma é constituída por moléculas solúveis e células específicas referenciadas na Tabela 3 (Cruvinel *et al.*, 2010).

Tabela 3 - Células e moléculas solúveis do sistema imunológico (Adaptada de Cruvinel *et al.*, 2010)

| <i>Componente</i>                | <i>Imunidade inata</i>  | <i>Imunidade adquirida</i>             |
|----------------------------------|---|--|
| <u><i>Células</i></u>            | Fagócitos: Células dendríticas (DC),<br>macrófagos e neutrófilos<br>Células NK<br>Mastócitos, basófilos e eosinófilos | Linfócitos T e B<br>DC                 |
| <u><i>Moléculas solúveis</i></u> | Complemento<br>Proteínas de fase aguda<br>Citocinas<br>Quimiocinas  | Anticorpos<br>Citocinas<br>Quimiocinas |

A imunidade inata representa uma resposta rápida e categorizada por um número grande, mas limitado, de estímulos. É representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, presentes em todos os indivíduos, independentemente de contacto prévio com imunogénios ou agentes agressores, e não se altera qualitativa ou quantitativamente após o contacto.

Fagocitose, libertação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, bem como síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas são os principais mecanismos na imunidade inata.

A imunidade inata também auxilia na ativação do sistema imune adaptativo e caracteriza-se pela rápida resposta à agressão, independentemente de estímulo prévio, sendo a primeira linha de defesa do organismo que atua de uma maneira não específica. A primeira defesa do organismo frente a um dano dos tecidos envolve diversas etapas intimamente integradas e constituídas pelos diferentes componentes desse sistema (Cruvinel *et al.*, 2010; Turksma *et al.*, 2013).

Em contraposição à resposta inata, a resposta imune adaptativa depende da ativação de células especializadas, os linfócitos, e das moléculas solúveis por eles produzidas. As principais características da resposta adquirida são: especificidade e diversidade de reconhecimento, memória, especialização de resposta, autolimitação e tolerância a componentes do próprio organismo. Embora as principais células envolvidas na resposta imune adquirida sejam os linfócitos, as células apresentadoras de antígenos (APC) desempenham um papel fundamental na sua ativação (Cruvinel *et al.*, 2010).

O sistema imune adaptativo é composto por células B e células T e envolve uma resposta humoral e celular resultante de reconhecimento de antígenos específicos ligado às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Moskovitz *et al.*, 2018).

O sistema imunológico inato e adaptativo apresentam funções coordenadas, representadas na Figura 4, com o objetivo de destruir as células cancerígenas. O sistema imune inato primeiro pode responder às proteínas anormais reconhecidas na superfície das células cancerígenas. Estas células podem matar as células cancerígenas, permitindo que muitos antígenos das células cancerígenas sejam libertados para o ambiente, sangue e sistema linfático. Consequentemente, há ativação das células B e T. As células B produzem anticorpos específicos para o antígeno processado ativado e libertado pelas células cancerígenas. As células T são ativadas e, em seguida, libertam proteínas citotóxicas na vizinhança das células cancerígenas. As células T ativadas podem se ligar

novamente à classe I do MHC se for expresso nas células cancerígenas e apresentar o antígeno reconhecido pelo recetor das células T para localizar e libertar proteínas citotóxicas (Messerschmidt *et al.*, 2016).

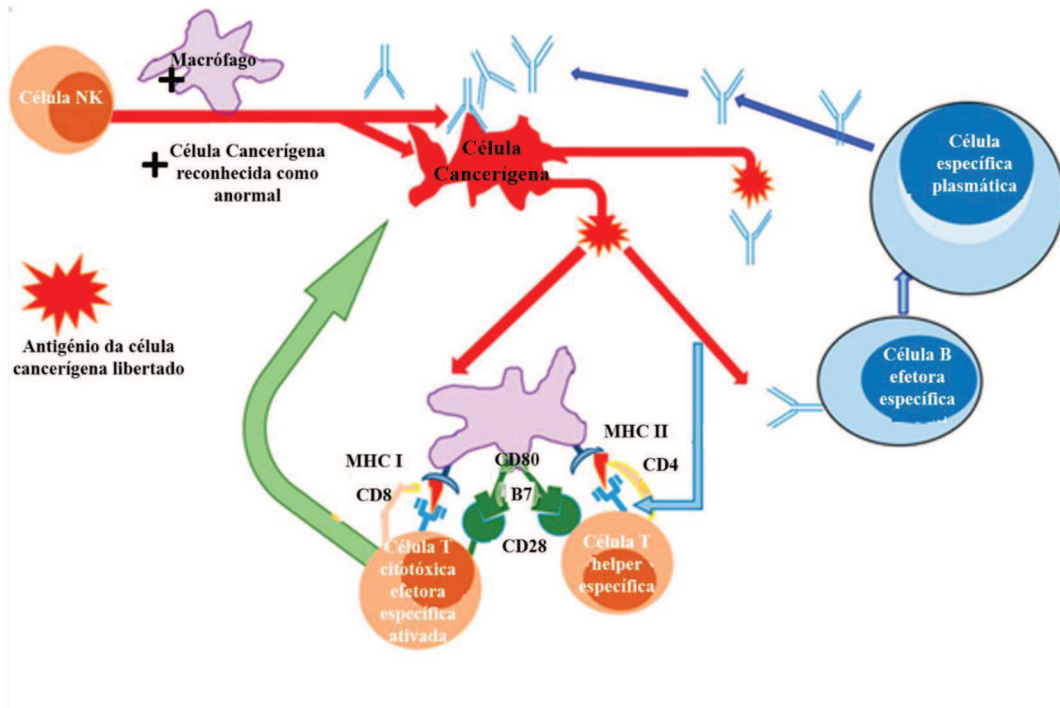


Figura 4 – As funções coordenadas do sistema imune inato e adaptativo para destruir as células cancerígenas (Adaptada de Messerschmidt *et al.*, 2016)

### 3.2 O papel do sistema imunitário sobre os tumores

Nas últimas décadas, tornou-se cada vez mais claro que o sistema imunológico desempenha um papel importante na prevenção do cancro por meio de um processo chamado vigilância imunológica (Bann *et al.*, 2016; Economopoulou *et al.*, 2015).

O cancro é causado pelo acúmulo de instabilidades genéticas e alterações epigenéticas em múltiplas fases, frequentemente levando à perda dos sistemas de regulação celular normal e à aquisição de fenótipos malignos. De acordo com a teoria da vigilância imunológica do cancro, as células neoplásicas com mutações oncogénicas são ativamente eliminadas pelo sistema imunológico dependente e independentemente dos TA, inibindo assim o desenvolvimento e a progressão do tumor (Figura 5). O processo de eliminação inclui respostas imunes inatas e adaptativas às células tumorais (Ishii *et al.*, 2015).

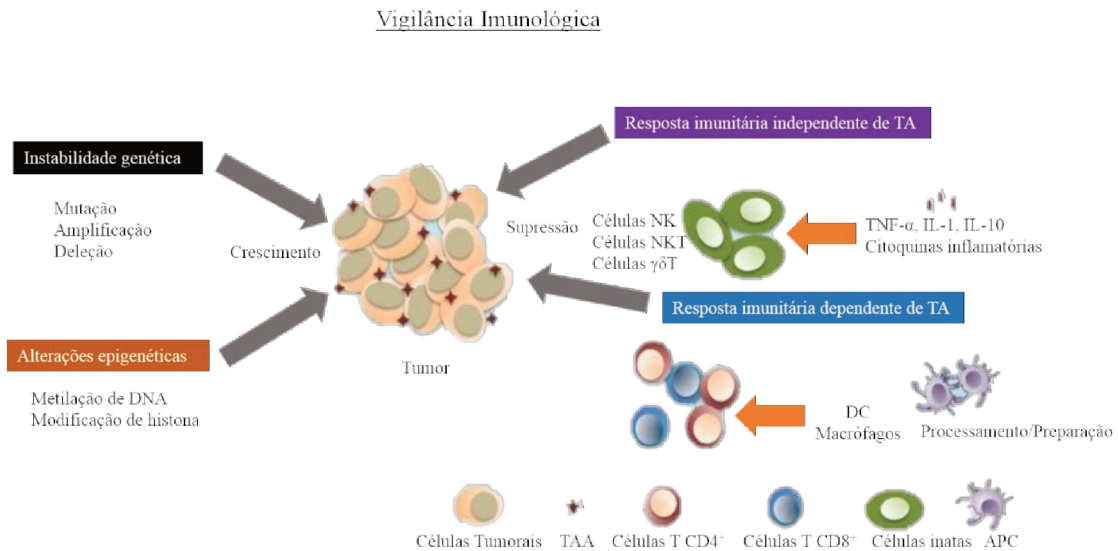


Figura 5 – Ilustração esquemática da vigilância imunológica (Adaptada de Ishii *et al.*, 2015)

Idealmente, o sistema imunológico reconhece as células tumorais num estado pré-maligno e destrói essas células a partir da sua libertação de antígenios, que são capturados pelas APC e, posteriormente, são apresentados às células T (Moskovitz *et al.*, 2018; Sadraei *et al.*, 2016).

No entanto, existem limites na capacidade do sistema imunológico de lutar contra o cancro por conta própria, o que é evidente pela existência de indivíduos com um sistema imunológico saudável e mesmo assim serem vítimas de cancro. Em certos casos, é impedida a deteção de células cancerígenas pois estas não são suficientemente distintas das células saudáveis. Noutras ocasiões, as células cancerígenas são reconhecidas, contudo a resposta pode não ser potente o suficiente para destruir o cancro. As células

malignas também podem libertar substâncias que mantêm o sistema imunológico sob controlo (American Cancer Society, 2016). Ou seja, as células tumorais têm a capacidade de evitar a vigilância imunológica a partir de uma variedade de mecanismos diferentes, incluindo expressão reduzida de TA, secreção de citocinas imunossupressoras como o TGF- $\beta$ , recrutamento de células imunossupressoras como Treg e superexpressão de certos ligandos, tal como o PD-L1 (Economopoulou *et al.*, 2015).

Independentemente da vigilância imunológica estar envolvida no cancro de um paciente, um tumor pode amadurecer e expandir para tecidos estromais mais profundos e órgãos distantes. O processo pelo qual o tumor escapa à vigilância imunológica é conhecido como fuga imunológica. Essa resistência imunológica é causada pela atenuação da imunogenicidade do tumor, pela regulação negativa do MHC classe I nas células tumorais e pela secreção de citocinas inibitórias que reprimem o sistema imunológico do hospedeiro (Ishii *et al.*, 2015).

Surge ainda o conceito de *immunoediting* do cancro no qual as células tumorais desenvolvem mecanismos para impedir o seu reconhecimento e respostas imunológicas que normalmente impediriam a fuga ao sistema imunitário (Moskovitz *et al.*, 2018). O *immunoediting* do cancro sugere um progresso evolutivo dinâmico pelo qual a vigilância imunológica dos cancros fornece pressão seletiva nas células tumorais e seleciona negativamente as células que podem escapar do sistema imunológico. Assim, a formação de tumores bem-sucedidos ocorre apenas depois do cancro descobrir um meio pelo qual possa escapar do sistema imunológico (Ferris, 2015).

Em relação ao HNSCC, primeiramente as células cancerígenas reduzem a sua imunogenicidade através de vários mecanismos (Tabela 4) e, em segundo, suprimem ativamente os sinais da resposta imune anti-tumoral (Figura 6) (Ferris, 2015).

Tabela 4 - Mecanismos de escape imune no HNSCC (Adaptada de Ferris, 2015)

| <i>Mecanismos</i>   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Desenvolvimento de tolerância de células T à infeção persistente por HPV, ou antigénios superexpressos/mutados;</li></ul> |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Produção de um número baixo de cópias do genoma na camada basal do epitélio;</li></ul>                                    |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Aumento da expressão de PD-L1 em tumores HPV+ e aumento da expressão de PD-1 em linfócitos T citotóxicos;</li></ul>       |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Desregulação de fatores reguladores de IFN e STAT1 ativado;</li></ul>   |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Inibição de citocinas inflamatórias e fatores de transcrição;</li></ul>   |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Desregulação ou mutação de MHC classe I e de <i>antigen processing and presenting machinery (APM)</i>.</li></ul>          |

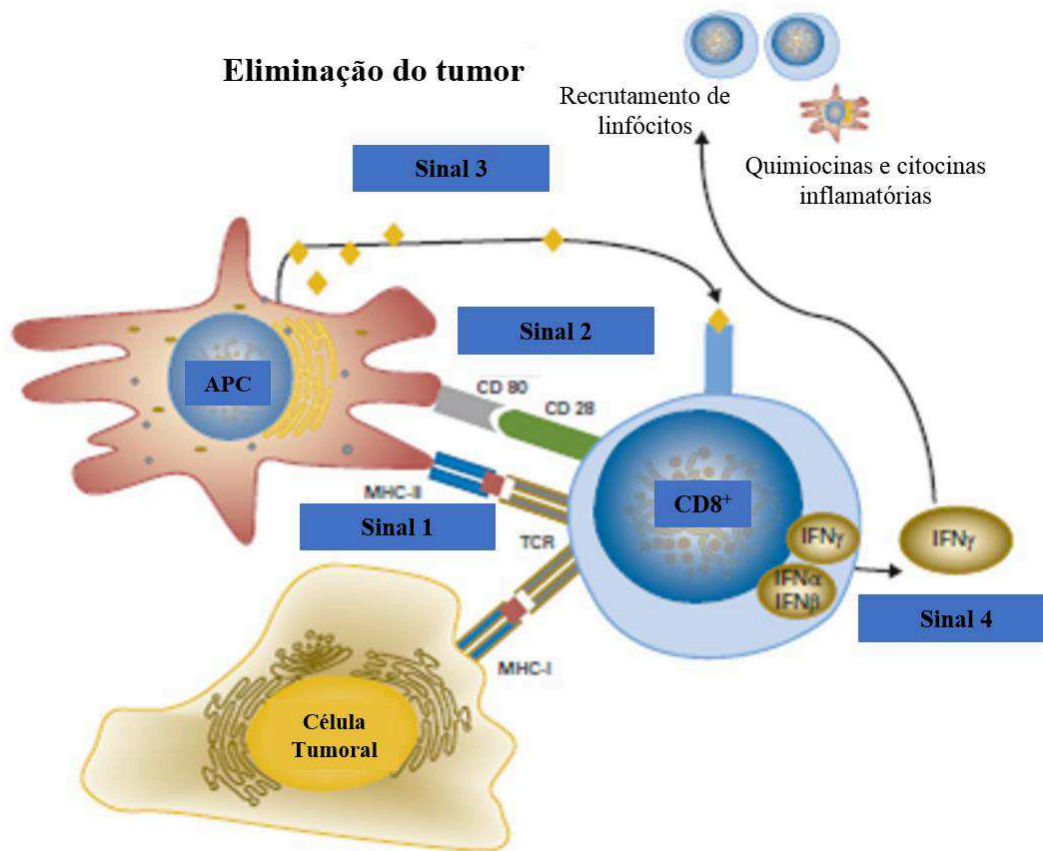


Figura 6 – Fuga imune em cada passo necessário para o desenvolvimento de uma forte imunidade anti-tumoral (Adaptada de Ferris, 2015) Sinal 1: TCR Interações antígeno MHC-péptido; Sinal 2: Sinais co-estimuladores (ou co-inibidores); Sinal 3: Secreção de citocinas, podem ser mediadores pró-inflamatórios, tipo 1 (Th1) ou citocinas tipo 2 (Th2) que premeiam o tumor; Sinal 4: Células extrínsecas que atraem, sinais de quimiocinas para recrutar populações imunes celulares para o microambiente tumoral e aumentar/amplificar ou suprimir imunidade anti-tumoral.

Vários mecanismos específicos de escape imune que conferem malignidade altamente imunossupressora ao HNSCC foram identificados, incluindo: indução de tolerância imunológica, evasão imune local e interrupção da sinalização de células T (Bann *et al.*, 2016 ; Xie *et al.*, 2017).

### 3.2.1 Tolerância imunológica

As células tumorais, incluindo as células do HNSCC, têm um alto grau de heterogeneidade genética com uma expressão variável de antígenos, compreendendo antígenos associados a tumores (TAA) e antígenos tumorais específicos (TSA). Células do HNSCC que apresentem níveis normais ou elevados de TAA ou TSA podem ser detetadas pelo sistema imunológico e eliminadas com maior probabilidade. Em contraste,

as células do HNSCC com nenhum ou baixos níveis de TSA ou TAA podem demonstrar baixa imunogenicidade e escapar da vigilância e eliminação imunológica. A inibição da apresentação do antígeno é um dos mecanismos dominantes pelos quais as células tumorais do HNSCC escapam do sistema imunológico. A interação entre o AT e os linfócitos T citotóxicos específicos de TA é necessária para a identificação de linfócitos T citotóxicos e a eliminação de células tumorais.

As moléculas de MHC I são as principais moléculas de MHC, que apresentam péptidos antigénicos tumorais processados para linfócitos T. As células tumorais podem restringir o reconhecimento mediado por células T pela regulação negativa ou mutação de moléculas MHC I e/ou componentes *antigen processing and presenting machinery* (APM) para enfraquecer a apresentação de antígenos (Ferris, 2015; Xie *et al.*, 2017).

Mutações ou regulação negativa nos genes componentes MHC/APM são um evento frequente no HNSCC. Investigadores relataram que a perda da expressão da proteína MHC classe I ocorreu em 50% dos HNSCC e correlacionou-se com metástases linfodonais regionais (Xie *et al.*, 2017).

### **3.2.2 Evasão ao sistema imunitário**

Para além da inibição da apresentação do antígeno, as células tumorais podem também desenvolver um microambiente supressor, promovendo a secreção de citocinas imunossupressoras ou quimiocinas no microambiente tumoral. Células do HNSCC têm a capacidade de libertar diretamente citocinas imunossupressoras, como TGF- $\beta$  e IL-10, que suprimem a proliferação de células T e a função citotóxica e regulam negativamente a expressão de moléculas co-estimulatórias e MHC. O recrutamento de células hematopoiéticas imunossupressoras para o microambiente tumoral é um dos mecanismos fundamentais de escape imunológico. Existem três tipos de células hematopoiéticas imunossupressoras que são recrutadas para o tumor: células supressoras derivadas de mielóides (MDSC), macrófagos associados a tumores (TAM) e Treg. O HNSCC tipicamente mostra infiltração extensa por MDSC. Os TAM foram reconhecidos como um fator chave na imunossupressão tumoral, migração e metástase, e associam-se com resultados clínicos pobres (Xie *et al.*, 2017).

### **3.2.3 Perturbações da sinalização de células T**

Os recetores de células T interagem com ligandos co-estimulantes e recetores ativadores e inibidores co-estimulatórios para fornecer identificação de sinal de células T. Células do HNSCC inibem o reconhecimento e a ativação mediada por células T não apenas pela regulação negativa da apresentação do antigénio MHC I ao recetor de células T endógeno, mas também pelas vias inibitórias de recetores co-estimulatórios para minimizar a função das células T. Os recetores co-estimulatórios inibitórios abrangem o PD-1, CTLA-4, imunoglobulina mucina 3 de células T-3 (Tim-3), gene 3 de ativação de linfócitos (LAG-3) e o domínio do motivo inibidor baseado na tirosina de células T (TIGIT), que foram relatados como sendo supra-regulados em células T exaustas isoladas de malignidades sólidas. Em células normais, a PD-1 liga-se aos seus ligandos PD-L1/PD-L2 para inativar as células T e amortecer a resposta imune. Todavia, a PD-L1 é expressa em inúmeras neoplasias sólidas e hematológicas, incluindo na maioria dos tumores do HNSCC, portanto, este “stop” imunológico é cooptado pelas células do HNSCC para evitar a eliminação imunológica, e, tem sido associado ao mau prognóstico em muitos tipos de cancro (Sadraei *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2017).

## 4. Imunoterapia

### 4.1 A Imunoterapia no Cancro

Com o objetivo de tentar ultrapassar as dificuldades do sistema imunitário sobre o controlo dos tumores, investigadores encontraram formas de ajudar o sistema imunológico no reconhecimento das células cancerígenas e a fortalecer a sua resposta para que seja possível destruir estas células (American Cancer Society, 2016).

O tipo de imunoterapia contra o cancro tem como princípio a utilização de componentes ou mecanismos do sistema imunológico de forma a eliminar e neutralizar células neoplásicas e/ou fatores que facilitem a sobrevivência e proliferação do tumor (Arosa *et al.*, 2007).

Este tipo de terapia foi descoberto na década de 1970, com início na terapia do cancro de bexiga com *bacillus Calmette-Guerin* (BCG) e na terapia com interferão (IFN) no melanoma maligno (Stanculeanu *et al.*, 2016).

Alguns tipos de imunoterapia podem também ser designados por terapia biológica ou bioterapia (National Cancer Institute, 2017).

A imunoterapia pode ser vantajosa na medida em que pode ser específica, reduzindo assim a toxicidade associada à terapia. Pode ser dinâmica dado que a resposta imunológica pode evoluir com o cancro e pode ser sistémica uma vez que tem a capacidade de atingir células metásticas (Andersen *et al.*, 2014; Wen & Grandis, 2015). Também induz respostas de memória que podem resultar em vigilância imunológica a longo prazo do tumor. Ao detetar e destruir continuamente as células cancerígenas, a imunoterapia pode diminuir a incidência de recaídas e aumentar a sobrevida livre de doença a longo prazo. Todas as formas de imunoterapia dependem das propriedades antigénicas do tumor (Schutt *et al.*, 2012; Wen & Grandis, 2015).

No entanto, o paradigma de que o sistema imunológico pode ser usado para tratar ou curar o cancro não é nova. Efetivamente, os primeiros estudos recorrendo à imunomodulação para a terapia do cancro foram testados há mais de um século. Apesar da longa história, a imunoterapia contemporânea anti-tumoral só alcançou sucesso clínico significativo na última década (Bann *et al.*, 2016).

Sucintamente, a imunoterapia no tratamento do cancro estimula a resposta anti-tumoral do hospedeiro aumentando o número de células efetoras e a produção de

mediadores solúveis e diminuindo os mecanismos supressores do hospedeiro, induzindo a eliminação do tumor e modulando os *checkpoint* imunológicos. Aparentemente, a imunoterapia tem um melhor funcionamento em tumores mais imunogénicos (Stanculeanu *et al.*, 2016).

Existem três tipos de APC: células dendríticas (DC), macrófagos e linfócitos B. Quando estas células encontram antígenos invasores, captam-nos por fagocitose ou endocitose, e fragmentam-nos em péptidos que são levados para a sua superfície celular, onde serão reconhecidos por recetores das células T. Desta forma, quando surge a correspondência entre a célula T e o antígeno expresso na superfície das APC, a célula T fica ativa e inicia a produção de agentes químicos que irão promover a destruição das células cancerígenas. Foi com base nestes princípios e na compreensão do funcionamento do sistema imunológico do organismo humano que a imunoterapia se desenvolveu como tratamento anti-tumoral (Graff & Chamberlain, 2015).

Esta terapia pode, resumidamente, corrigir, estimular ou melhorar a função do sistema imunológico na destruição das células cancerígenas. No caso da imunoterapia local, esta oferece tratamento diretamente sobre tumor e a imunoterapia sistémica atinge todo o corpo e pode ser útil para suspender a metastização ou a recorrência de tumores primários em cancros mais avançados. Com base nos mecanismos de ação, a imunoterapia pode ser amplamente dividida em diferentes categorias, como imunoterapia baseada em vacinas, imunoterapia de transferência celular adotiva (ACT), imunoterapia baseada na inibição do *checkpoint* imunológico e outras abordagens (Chan *et al.*, 2015).

A imunoterapia apresenta melhores resultados para certos tipos de cancro. Nalguns casos é aplicada individualmente, porém, noutras situações, parece haver um melhor funcionamento da terapia quando utilizada com outros tipos de tratamento (American Cancer Society, 2016).

Geralmente, o tratamento de modalidade única pode ser escolhido para doenças num estadio inicial, enquanto estadios avançados requerem uma abordagem multidisciplinar (Wen & Grandis, 2015).

Embora apenas uma pequena percentagem dos pacientes responda à imunoterapia como monoterapia, as respostas observadas são comumente duradouras e profundas (Moskovitz *et al.*, 2018).

Este novo tratamento inclui, tal como os outros, efeitos colaterais, porém, alguns dos efeitos surgem vários anos após a terapia estar terminada. As toxicidades associadas à imunoterapia diferem da terapia sistémica tradicional. A maior parte destes efeitos

secundários é autoimune quando comparados com efeitos típicos como a insuficiência renal e anemia que são observadas na terapia citotóxica padrão (Moskovitz *et al.*, 2018).

Os efeitos colaterais da imunoterapia vão afetar diferentemente cada indivíduo e dependerão do estado de saúde do paciente, do tipo de cancro, do tipo de terapia e das dosagens. Os mais frequentes são as reações cutâneas no local da agulha. Outros efeitos podem ser (American Cancer Society, 2016):

- Dor
- Tumefação
- Vermelhidão
- Prurido
- Erupção cutânea

Sintomas idênticos à gripe como:

- Febre
- Arrepios
- Fraqueza
- Tontura
- Náusea ou vômito
- Dores musculares ou articulares
- Fadiga
- Dor de cabeça
- Problemas respiratórios
- Hipertensão ou Hipotensão

Pode estar incluído:

- Aumento de peso e de retenção de líquidos
- Palpitações cardíacas
- Congestionamento dos seios
- Diarreia
- Risco de infecção

A imunoterapia pode também provocar reações alérgicas graves ou mesmo fatais, mas o seu aparecimento é incomum (American Cancer Society, 2016).

As vias de administração disponibilizadas são a intravenosa, oral, tópica e intravesical. A frequência e a duração do tratamento dependerão do tipo de cancro e do seu avanço,

do tipo de imunoterapia e a reação do organismo ao tratamento. Pode também ser administrada em ciclos (National Cancer Institute, 2017).

Nas últimas décadas, a imunoterapia tornou-se um membro relevante no tratamento de certos tipos de cancro, fornecendo respostas duradouras para pacientes com cancro em estado avançado (Economopolou *et al.*, 2017).

Considera-se que a imunoterapia é uma área promissora para a terapia do HNSCC, pois tem a capacidade de mobilizar o sistema imunológico com efeitos reduzidos nos tecidos saudáveis, de forma a atingir as células cancerígenas que expressam TSA (Wen & Grandis, 2015).

Compreender o complexo equilíbrio das interações das células imunitárias e a sinalização celular avançou significativamente e levou a um interesse renovado em imunoterapia como uma cura potencial para vários tipos de tumores sólidos, incluindo o HNSCC (Moskovitz *et al.*, 2018).

Resultados atuais de ensaios de imunoterapia demonstraram pela primeira vez uma melhoria da taxa de resposta e sobrevida global em pacientes com HNSCC recorrente ou metastático. Ainda que a imunoterapia forneça uma opção para o tratamento do cancro a pacientes que anteriormente não tinham opções, clínicos e cientistas estão a aprender que o complexo sistema imunológico é esculpido pelo cancro e que diferentes tipos de cancro induzem algumas mudanças que são semelhantes, mas também outras diferentes (Moskovitz *et al.*, 2018).

Com o aumento da compreensão das alterações moleculares associadas à carcinogénese do HNC, novas terapias direcionadas estão a ser desenvolvidas para superar essas mudanças moleculares. Estas alterações podem estar associadas à proliferação autónoma, desregulação dos sinais inibidores do crescimento, evasão de apoptose, desenvolvimento de imortalização, angiogénese induzida por tumor e invasão e metástase de tecidos. Terapias direcionadas contra qualquer uma dessas mudanças pode representar oportunidades terapêuticas (Chan *et al.*, 2015). Contudo, a cirurgia, quimioterapia e radioterapia continuam a ser utilizadas mais amplamente (American Cancer Society, 2016).

Atualmente, um dos maiores desafios é o desenvolvimento de estratégias alternativas de tratamento que melhorem o subconjunto de pacientes que possam responder à imunoterapia (Economopoulou *et al.*, 2017).

## 4.2 Tipos de Imunoterapia

Os tumores têm muitas maneiras de subverter o sistema imunológico. Várias estratégias imunoterapêuticas foram projetadas para recuperar o equilíbrio através da erradicação do tumor e podem ser divididas em imunoterapia passiva e ativa. Na imunoterapia passiva, o paciente recebe anticorpos terapêuticos ou ACT, contornando assim a necessidade de ativar o sistema imunológico do paciente. A imunoterapia ativa, como a administração de citocinas ou a vacinação baseada em DC, tem como objetivo estimular o próprio sistema imunológico do paciente para montar uma resposta anti-tumoral contra o tumor (Turksma *et al.*, 2013). Dentro do espectro das imunoterapias disponíveis contra o cancro, cada uma apresenta as suas vantagens e desvantagens, representadas na tabela 5 (Farkona *et al.*, 2016).

Tabela 5 - Espectro das imunoterapias disponíveis (Adaptada de Farkona, 2016)

| <i>Estratégia</i>  | <i>Mecanismo Básico e principais vantagens</i>  | <i>Principais desvantagens</i>  |
|--|---|---|
| <p><b><u>Citocinas</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>IL-2</b></li> <li>• <b>IFN-<math>\alpha</math></b></li> </ul>                             | <p>Estimula o sistema imunitário do hospedeiro.</p> <p>Estimula o sistema imunitário do hospedeiro; Respostas duradouras (de um pequeno subconjunto de pacientes com melanoma).</p>   | <p>Taxas de resposta baixas; Risco significativo de inflamação sistêmica grave.</p> <p>Taxas de resposta baixas; Toxicidade por altas doses.</p>  |
| <p><b><u>Terapias baseadas em células</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Vacinas</b></li> <li>• <b>Transferência celular adotiva</b></li> </ul> | <p>Estimulam o sistema imunitário do hospedeiro; Toxicidade mínima (por ex: Sipuleucel-T); Administradas em ambulatorio.</p> <p>Omite a tarefa de quebrar a tolerância a TA; Produz uma alta avidéz em células T efetoras; Linfodepleção antes da infusão de TIL aumenta a eficácia; Engenharia das células T genéticas estende os TIL para malignidades para além do melanoma.</p> | <p>Falta de antígenos universais e de protocolos de imunização ideal levam a respostas fracas.</p> <p>Restrita ao melanoma; Em muitos pacientes há problemas de segurança, efeitos adversos graves e falta de respostas duradouras; Requer tempo para obter a população de células desejada; Custo elevado.</p> |
| <p><b><u>Inibidores do checkpoint imunológico</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Anti-CTLA4</b></li> </ul>                                      | <p>Liberta respostas de células T anti-tumorais pré-existentes e possivelmente liberta novas respostas também; Exibe propriedades anti-</p>   | <p>Apenas uma fração relativamente pequena de pacientes obtém benefício clínico; Efeitos adversos</p>   |

|  |   |  |
|--|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Anti-PD1 e PDL1</b></li> </ul>                               | <p>tumorais potentes; Prolongamento da sobrevida global.</p> <p>Respostas clínicas suficientes que são geralmente de longa duração; Respostas terapêuticas de pacientes dentro de uma ampla gama de neoplasias humanas; Toxicidade reduzida em comparação com os anticorpos anti-CTLA4.</p> | <p>severos relacionados com o sistema imunológico foram observados até 35% dos pacientes.</p> <p>Apenas uma fração relativamente pequena de pacientes obtém benefício clínico.</p> |
| <p><b><u>Imunoterapia combinada (inibidores do checkpoint imunológico como terapia primária)</u></b></p> | <p>Melhoria das respostas anti-tumorais/imunidade.</p>  | <p>Pode levar ao aumento da magnitude, frequência e início dos efeitos colaterais.</p>   |

Os principais tipos de imunoterapia atualmente utilizados para tratar o cancro incluem (American Cancer Society, 2016):

#### 4.2.1 Anticorpos monoclonais

Uma forma do sistema imunológico atacar substâncias estranhas no corpo é produzindo um grande número de anticorpos. Um anticorpo é uma proteína que adere a um antígeno. Os anticorpos circulam por todo o corpo até encontrarem um antígeno e se ligarem a este. Uma vez anexados, podem recrutar outros constituintes do sistema imunológico para destruir as células que contêm o antígeno. Os investigadores podem criar em laboratório anticorpos que se fixem especificamente a um determinado antígeno, como os encontrados nas células cancerígenas (American Cancer Society, 2016).

Outros tipos de mAB podem "marcar" células cancerígenas, por isso é mais fácil para o sistema imunológico localizá-las e destruí-las. Estes tipos de mAB também podem ser referidos como terapia direcionada (National Cancer Institute, 2017).

Os mAB podem ser classificados em nus ou em conjugados. Os nus são anticorpos que funcionam isolados e são o tipo mais comum de mAB utilizados para tratar o cancro. A maioria destes anticorpos liga-se aos antígenos das células cancerígenas, mas alguns funcionam ligando-se a antígenos de outras células não cancerígenas ou mesmo a proteínas que flutuam livremente. Os conjugados são unidos a um fármaco de quimioterapia ou a uma partícula radioativa. O mAB é usado como um dispositivo de localização para transportar uma dessas substâncias diretamente às células neoplásicas levando à diminuição do dano das células normais noutras áreas do corpo. Estes anticorpos também podem ser formados por duas partes diferentes de mAB, o que significa que se podem unir a duas proteínas diferentes simultaneamente.

Os mAB são proteínas administrados por via intravenosa o que pode provocar uma reação alérgica. Esta reação é mais comum quando o fármaco é dado pela primeira vez. Possíveis efeitos colaterais podem incluir febre, arrepios, fraqueza, dor de cabeça, náusea, vômito, diarreia, hipotensão e erupção cutânea. Em comparação com fármacos quimioterapêuticos, os mAB nus tendem a provocar menos efeitos colaterais graves. Alguns mAB podem ter efeitos colaterais relacionados com os antigénios a que se ligam (American Cancer Society, 2016).

Os mAB têm uma vasta aplicação no tratamento de patologias, incluindo alguns tipos de cancro. Para produzir um mAB, é preciso identificar o antigénio que se pretende atacar/reconhecer. Para o cancro, nem sempre é fácil, e a eficácia dos mAB varia conforme o tipo de doença oncológica.

Nas últimas duas décadas, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou mais de uma dúzia de mAB para tratar certos tipos de cancro. São descobertos cada vez mais antigénios ligados ao cancro o que tem permitido a maior produção de mAB (American Cancer Society, 2016).

Embora estes anticorpos atinjam uma gama de moléculas, muitos anticorpos medeiam os seus efeitos anti-tumorais através de mecanismos semelhantes, incluindo o direcionamento de células tumorais para citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC), a inibição direta de sinais de crescimento tumoral e a inibição de vias de sinalização envolvidas na manutenção da autotolerância imunológica (Bann *et al.*, 2016).

### **4.2.2 Citocinas**

Como consequência da sua ação direta no desenvolvimento e execução de respostas imunes ou da ação reguladora da imunidade, as citocinas foram desde cedo consideradas como agentes ideais para a imunoterapia de tumores. O uso de citocinas em imunoterapia tumoral tem por objetivo a mobilização ou a estimulação de estratégias imunes celulares ou humorais (Arosa *et al.*, 2007).

As citocinas são uma família diversa de pequenas proteínas sinalizadoras não estruturais que desempenham diversos papéis na modificação de respostas imunes e inflamatórias. É importante ressaltar que evidências progressivas indicam que os tumores modulam o ambiente da citocina local para produzir um ambiente pró-inflamatório, ao mesmo tempo em que facilitam a evasão do sistema imunológico do tumor. Por

consequente, alterando a resposta das citocinas, proporcionando misturas exógenas de citocinas, pode facilitar a resposta imune anti-tumoral (Bann *et al.*, 2016).

Duas imunoterapias comuns incluídas no grupo das moléculas mensageiras que ajudam a controlar o crescimento e a atividade das células do sistema imunológico, são (National Cancer Institute, 2017; Stanculeanu *et al.*, 2016):

**I. Interferões:** Ajudam o sistema imunológico a combater o cancro e podem diminuir o crescimento das células cancerígenas. Um IFN produzido em laboratório é denominado de IFN alfa. É o tipo mais comum de IFN utilizado no tratamento do cancro. Os efeitos colaterais do tratamento com IFN podem incluir sintomas parecidos com a gripe, aumento do risco de infeção, erupção cutânea e alopecia (American Society of Clinical Oncology, 2017).

**II. Interleucinas:** As interleucinas ajudam o sistema imunológico a produzir células que destroem o cancro. Quando sintetizadas em laboratório são chamadas de IL-2 ou aldesleucina (aroleucina). São usadas para tratar o cancro do rim e da pele, incluindo melanoma. Os efeitos secundários comuns do tratamento com IL-2 incluem aumento de peso e hipotensão. Alguns indivíduos também podem sentir sintomas gripais (American Society of Clinical Oncology, 2017).

#### **4.2.3 Inibidores do *Checkpoint* imunológico**

Entre as abordagens mais promissoras para ativar a imunidade anti-tumoral terapêutica encontra-se o bloqueio dos *checkpoint* imunológicos. Os *checkpoint* imunológicos referem-se a uma infinidade de vias inibitórias ligadas ao sistema imune que são cruciais para manter a autotolerância e modular a duração e a amplitude das respostas imunes fisiológicas nos tecidos periféricos, a fim de minimizar o dano colateral ao tecido (Pardoll, 2012).

Para além de intervirem na tolerância imunológica no tecido normal também atuam na imunossupressão no tecido tumoral (Ishii *et al.*, 2015). Também foi demonstrado que os *checkpoint* imunológicos desempenham um papel importante no microambiente tumoral e podem ser manipulados como um mecanismo de evasão imunológica do tumor (Ferris, 2015).

Infelizmente, a desregulação destes *checkpoint* imunológicos pode criar um ambiente permissivo para o desenvolvimento do cancro e também pode ser usurpado pelas células cancerígenas e pelo microambiente tumoral circundante, contribuindo assim para a

tolerância imunológica periférica e evasão imune tumoral. Logo, as terapias que inibem ou incapacitam estes *checkpoint* podem, portanto, quebrar a tolerância imunológica aos TAA e induzir uma resposta imune anti-tumoral do hospedeiro (Bann *et al.*, 2016; Pai *et al.*, 2016).

Estudos imunológicos básicos mostraram que alguns recetores e ligandos relacionados com *checkpoint* imunológicos são expressos em ambientes inflamatórios *in vivo*. É o caso dos *checkpoint* imunológicos CTLA-4 e PD-1 que desempenham um papel importante no microambiente tumoral, cuja imunossupressão pode ser observada em vários tipos de cancro (Ishii *et al.*, 2015; Moskovitz *et al.*, 2018).

Atualmente, vários inibidores de *checkpoint* estão comercialmente disponíveis ou estão a ser submetidos a ensaios clínicos que têm como principais alvos a PD-1 e o CTLA-4. PD-1 é um recetor da superfície celular expresso em células B e T ativadas que se ligam aos ligandos PD-L1 e PD-L2. Como a ativação da PD-1 pela ligação do ligando diminui a resposta inflamatória, a inibição da PD-1 pela ligação direta do anticorpo ou pela PD-L1 ou PD-L2 pode aliviar a tolerância imunológica, promovendo a lise tumoral mediada por células imunes. O CTLA-4 é expresso na superfície das células T ativadas e limita a atividade das células T. É importante referenciar que a terapia eficaz de inibição do *checkpoint* requer a presença de células T CD8 + na periferia do tumor (Bann *et al.*, 2016).

#### **4.2.4 Transferência celular adotiva**

A ACT é uma forma inovadora de imunoterapia que explora as propriedades anti-tumorais dos linfócitos para erradicar células tumorais primárias e metastáticas (Farkona *et al.*, 2016). Também denominada de terapia com células T, é um tratamento que tenta aumentar a capacidade natural do tipo T de glóbulos brancos através da utilização de células como os TIL (Chan *et al.*, 2015).

Este procedimento é realizado através da seleção de células T do sangue periférico, dos gânglios linfáticos que drenam para o tumor ou do tecido tumoral dos pacientes, em que são posteriormente isoladas as mais ativas contra o cancro em específico ou modificam os genes destas para torná-las mais eficazes (Farkona *et al.*, 2016; National Cancer Institute, 2017).

Esta estratégia consiste na administração ao doente de células imunes que foram estimuladas e expandidas *ex vivo* para discriminar e lisar células tumorais (Arosa *et al.*, 2007).

A primeira imunoterapia efetiva ACT para cancro foi relatada em 1988 e mostrou que os TIL cultivados e isolados de melanomas metastáticos ressecados e administrados a pacientes autólogos poderiam mediar regressões objetivas de cancro. A eficácia desta terapia com células T melhorou drasticamente em 2002, com a descoberta de que a linfodepleção prévia à administração de células T poderia melhorar a atividade anti-tumoral das células transferidas (Rosenberg, 2014).

A ACT tem múltiplas vantagens em comparação com outras formas de imunoterapia de cancro que dependem do desenvolvimento ativo *in vivo* do número de células T anti-tumorais com as funções necessárias para mediar a regressão do cancro, mas, apresenta um fator importante que limita o seu uso bem-sucedido em humanos (Tabela 6) (Rosenberg & Restifo., 2015).

Tabela 6 - Vantagens e desvantagens da ACT (Adaptada de Rosenberg & Restifo, 2015)

|                     |  |
|---------------------|--|
| <b>Vantagens</b>    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Um grande número de linfócitos anti-tumorais (até <math>10^{11}</math>) pode ser facilmente cultivado <i>in vitro</i> e selecionado para reconhecimento de alta avidéz do tumor, bem como para as funções efetoras necessárias para mediar a regressão do cancro;</li> <li>• A ativação <i>in vitro</i> permite que essas células sejam libertadas dos fatores inibitórios que existem <i>in vivo</i>;</li> <li>• Talvez o fator mais importante, a ACT permite a manipulação do hospedeiro antes da transferência de células para fornecer um microambiente favorável que suporta melhor a imunidade anti-tumoral;</li> <li>• A ACT é considerada um tratamento “vivo” porque as células administradas podem proliferar <i>in vivo</i> e manter as suas funções efetoras anti-tumorais.</li> </ul> |
| <b>Desvantagens</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dificuldade na identificação de células que podem atingir antigénios seletivamente expressos no cancro e não em tecidos normais essenciais.</li> </ul>  |

A ACT é uma terapia oncológica altamente personalizada que envolve administração de células imunes com atividade anti-tumoral direta no hospedeiro portador de cancro. A ACT usando linfócitos reativos a tumores que ocorrem naturalmente tem mediado regressões duradouras e completas em pacientes com melanoma, provavelmente por atingir mutações somáticas exclusivas para cada cancro. Estes resultados expandiram o

alcance da ACT para o tratamento de cânceros epiteliais comuns (Rosenberg & Restifo, 2015).

A ACT tem utilizado células hospedeiras naturais que exibem reatividade antitumoral ou células hospedeiras que foram geneticamente modificadas para expressar receptores de células T (TCR) ou receptores de antígenos quiméricos (CAR). Com o uso destas abordagens, a ACT estendeu ainda mais a sua aplicação bem-sucedida contra o cancro, contribuindo para regressões bastante consideráveis numa variedade de histologias de cancro, incluindo melanoma, cancro do colo do útero, linfoma, leucemia, cancro do ducto biliar e neuroblastoma (Rosenberg & Restifo, 2015).

**I. TCR:** Envolve a expressão das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do TCR que conferem à célula T alterada a especificidade antigénica do TCR transferido (Farkona et al., 2016). Reconhecem antígenos que foram processados e apresentados por uma das moléculas de MHC do próprio paciente (Rosenberg & Restifo, 2015).

**II. CAR:** A utilização de CAR que consiste num domínio variável de Ig ligado a um domínio constante de TCR (Farkona et al., 2016).

Os CAR são receptores artificiais que podem ser construídos ligando as regiões variáveis das cadeias pesadas e leves do anticorpo a cadeias de sinalização intracelular (tais como CD3-zeta, CD28, 41BB) sozinhas ou em combinação com outras porções sinalizadoras. Os CAR reconhecem antígenos que não precisam de ser apresentados pela molécula de MHC, mas devem ser apresentados na superfície da célula tumoral (Rosenberg & Restifo, 2015).

#### **4.2.5 Vacinas**

As vacinas são substâncias injetadas no interior do corpo, tipicamente compostas por microrganismos enfraquecidos ou destruídos, como vírus e bactérias, com o intuito de preparar o sistema imunitário contra certas doenças. A maioria das vacinas contra o cancro funciona da mesma forma, a diferença é fazer com que o sistema imunológico aumente a resposta específica de células T e/ou B contra as células tumorais. (American Cancer Society, 2016; Chan *et al.*, 2015).

Historicamente, a abordagem primária para ativar especificamente células T hospedeiras contra TA foi a vacinação terapêutica contra o cancro. Além do uso bem-sucedido de vacinas preventivas utilizadas na defesa contra o cancro causador de doenças infecciosas, incluindo o vírus da hepatite B e o HPV, o conhecimento de que pacientes

portadores de células T CD8 + e CD4 + capazes de reconhecer TA sugere a possibilidade de desenvolver vacinas contra o cancro (Farkona *et al.*, 2016).

A vacinação contra o cancro compreende uma série de abordagens que procuram gerar, amplificar ou distorcer (ou uma combinação delas) a imunidade anti-tumoral. As primeiras vacinas, que foram desenvolvidas entre 1994-95, testaram TAA partilhados não-mutantes, que demonstraram ser imunogénicos e capazes de induzir respostas clínicas numa pequena população com cancro num estadio final. A evolução tecnológica nos últimos anos permitiu a investigação de vacinas que têm como alvo antígenos mutados específicos do paciente. Várias plataformas para vacinação contra o cancro estão a ser testadas, incluindo péptidos curtos, proteínas inteiras (com ou sem adjuvantes), vírus, DNA (ou vírus mais DNA em sequência), DC, células tumorais (mortas) e lisados de tumor (Figura 7). Estes elementos podem ser modificados, adicionados a adjuvantes ou combinados. Abordagens de tratamentos padrão como a ablação de tumores, certas quimioterapias e a radiação também podem ter efeitos semelhantes aos da vacina, promovendo imunidade específica do tumor (Butterfield, 2015).

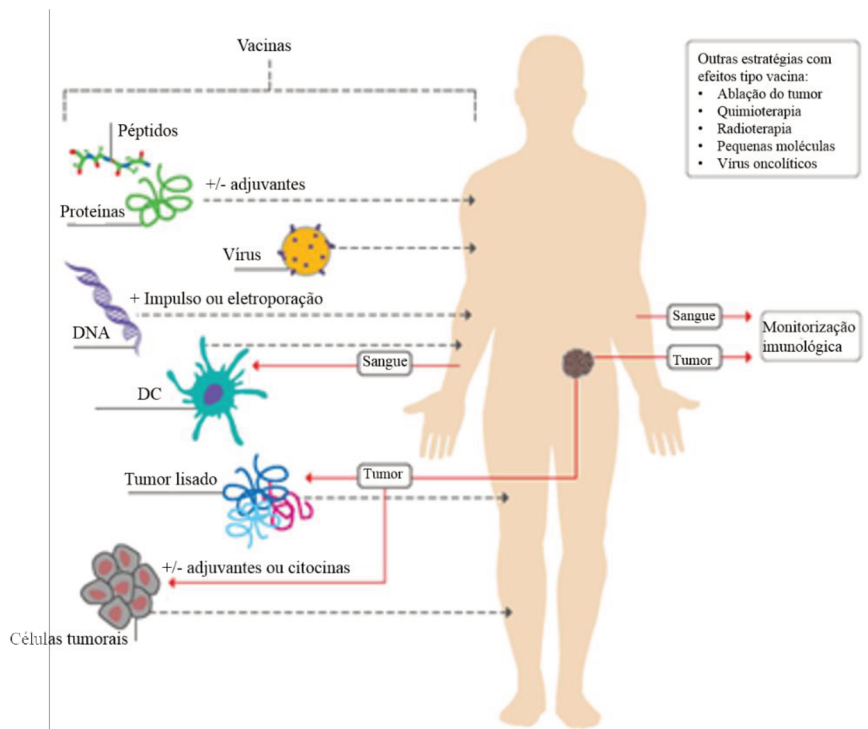


Figura 7 – Diferentes abordagens de vacinas contra o cancro (Adaptada de Butterfield, 2015)

Os vários mecanismos efetores imunitários produzidos pela vacinação terapêutica atacam e destroem células cancerígenas e poupam as células normais. Assim, as vacinas terapêuticas contra o cancro, em princípio, podem ser utilizadas para inibir o crescimento

adicional de cancros avançados e/ou tumores recidivantes que são refratários a terapias convencionais, tais como cirurgia, radioterapia e quimioterapia (Guo *et al.*, 2013).

O objetivo destas vacinas é ajudar a tratar o cancro ou evitar a recidiva após os tratamentos. Também existem vacinas que realmente podem auxiliar na prevenção contra alguns tipos de tumores (American Cancer Society, 2016; Chan *et al.*, 2015).

**I. Vacinas para ajudar a prevenir o cancro:** As vacinas podem ajudar a prevenir alguns dos cancros causados por vírus, como é o caso do HPV, responsável pelo cancro cervical e orofaríngeo, visto que são capazes de proteger contra infeções provocadas por estes. Estas são vacinas tradicionais que atingem os vírus, mas não afetam as células cancerígenas diretamente (American Cancer Society, 2016).

**II. Vacinas para ajudar a eliminar o cancro:** Algumas vacinas de tratamento do cancro são constituídas por células cancerígenas, partes de células ou antigénios puros. Ocasionalmente, as células imunitárias do próprio paciente são extraídas e expostas a essas substâncias no laboratório para criar a vacina. Assim que a vacina estiver finalizada, é injetada no corpo para aumentar a resposta imune contra os tumores. As vacinas são frequentemente combinadas com outras substâncias ou adjuvantes que ajudam a exacerbar a resposta imune (American Cancer Society, 2016).

As vacinas contra o cancro fazem com que o sistema imune ataque as células com um ou mais antigénios específicos. Como o sistema imunológico possui células de memória, espera-se que a vacina continue a funcionar muito depois de ser administrada. Atualmente, a Sipuleucel-T (Provenge) é a única vacina aprovada nos EUA para tratar o cancro. É usada para tratar cancro da próstata avançado quando já não se obtém resultados da terapia hormonal (American Cancer Society, 2016).

#### **4.2.6 Vírus oncolíticos**

Vírus que se replicam seletivamente nas células cancerígenas, levando à morte da célula, estão a ser estudados pelo seu potencial como terapia contra o cancro. Alguns destes vírus ocorrem naturalmente, mas raramente são responsáveis por doenças em humanos (Donnelly *et al.*, 2013).

Outros foram projetados através da engenharia genética para serem especificamente capazes de destruir células cancerígenas enquanto poupam as células normais. A terapia do vírus oncolítico consiste na utilização destes vírus geneticamente modificados para eliminar células cancerígenas (American Society of Clinical Oncology, 2017). Primeiro é injetado um vírus no tumor que invade as células cancerígenas destruindo a célula à

medida que o vírus se vai replicando e pequenos vírus são libertados com o intuito de se espalharem e replicarem pelas células vizinhas. A resposta normal à infeção viral é o desencadeamento de moléculas específicas dentro da célula, levando à produção de IFN tipo 1. Essas citocinas têm um efeito antiviral direto e desligam a replicação viral. Nas células cancerígenas, as mutações genéticas resultam na perda desta inibição do IFN (Figura 8) (Donnelly *et al.*, 2013). Em contraste com as vacinas padrão baseadas em vírus, os vírus oncolíticos infetam e lisam diretamente as células tumorais *in situ*. (Kaufman *et al.*, 2015)

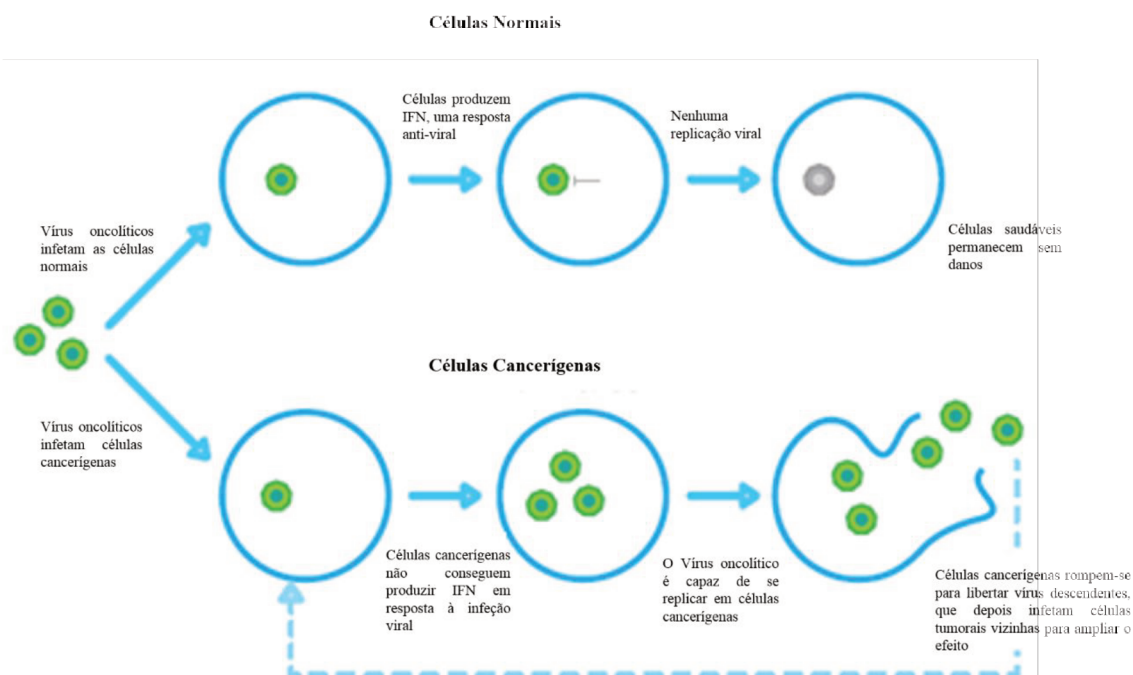


Figura 8 – Um mecanismo pelo qual os vírus oncolíticos podem replicar-se seletivamente nas células cancerígenas (Adaptada de Donnelly *et al.*, 2013)

Muitas das características do cancro, como a proliferação prolongada, a invasão aos programas apoptóticos celulares e inativação dos supressores de crescimento favorecem a replicação seletiva de vírus oncolíticos em células malignas com toxicidade mínima para tecidos normais (Farkona *et al.*, 2016).

Acredita-se que os vírus oncolíticos promovam respostas anti-tumorais principalmente por meio de dois mecanismos distintos de ação: replicação seletiva dentro das células neoplásicas, resultando num efeito lítico direto nas células tumorais e indução/iniciação da imunidade anti-tumoral sistémica (Farkona *et al.*, 2016; Kaufman *et al.*, 2015).

A contribuição relativa desses mecanismos pode diferir dependendo da natureza e do tipo de célula neoplásica, das características do vetor viral e da interação entre o vírus, do microambiente tumoral e do sistema imune do hospedeiro (Kaufman *et al.*, 2015).

A nível molecular e celular, os mecanismo de ação ainda não estão completamente esclarecidos, mas provavelmente dependem da replicação viral das células transformadas, indução de morte celular primária, interação com elementos antivirais de células tumorais e início da imunidade anti-tumoral inata e adaptativa (Kaufman *et al.*, 2015).

Em outubro de 2015, a FDA aprovou a primeira terapia de vírus oncolítico para tratar o melanoma. O vírus utilizado no tratamento é chamado de *talimogene laherparepvec* (Imlygic) ou T-VEC. O vírus é uma versão geneticamente modificada do vírus herpes simplex. O médico injeta T-VEC diretamente em áreas de melanoma que um cirurgião não pode remover. Os efeitos secundários podem incluir: fadiga, febre, arrepios, náuseas e dor no local da injeção (American Society of Clinical Oncology, 2017).

### 4.3 Imunoterapia no Cancro Oral

Em comparação com outros tipos de cancro, a imunoterapia em pacientes com HNSCC não foi extensivamente investigada, apesar dos tratamentos padrão atuais proporcionarem uma taxa de sobrevivência de 5 anos moderada na melhor das hipóteses. A maioria das estratégias imunoterapêuticas tem sido aplicada em pacientes com melanoma, em parte devido à natureza imunogénica e à acessibilidade dos tumores primários. O estado do sistema imunológico dos pacientes com HNSCC é notoriamente debilitado. Em pacientes com este carcinoma, as células T específicas para TA foram medidas e demonstraram sofrer rapidamente apoptose e altas percentagens de Treg foram observadas. Isto pode ser considerado um obstáculo extra para a obtenção de estratégias terapêuticas imunológicas para esses pacientes.

Existem muitos tipos de imunoterapia, todos atuando de maneiras diferentes para mudar o equilíbrio da imunidade anti-tumoral. No entanto, nem todos os tipos são adequados para pacientes com HNSCC. Para uma correta abordagem imunoterapêutica personalizada deve ser levado em consideração o *status* de HPV do tumor e o estado imunológico geral do paciente. Primeiro, uma distinção entre pacientes com tumores com HPV+ e HPV- deve ser feita. Pacientes com um estado imunológico relativamente favorável devem beneficiar da imunoterapia ativa, por exemplo, pela administração de vacinas de DC carregadas com TA. O tratamento imunoterapêutico de doentes com tumores HPV+ pode ser uma primeira abordagem sensata, já que o sistema imunológico de tais pacientes é frequentemente menos comprometido. É importante ressaltar que as células tumorais HPV+ podem ser muito especificamente direcionadas, sem danos colaterais aos tecidos saudáveis. Para pacientes com um sistema imunológico deficiente, independentemente do estado de HPV, a imunoterapia ativa pode não ser a primeira escolha de tratamento. A imunoterapia passiva, na forma de ACT de TIL expandidos *ex vivo* ou células T transgênicas de TCR, pode ser benéfica para tais pacientes. Aumentar a resposta imunológica aproveitando a inibição de células T ativadas com anticorpos dirigidos contra CTLA-4 pode ser benéfico para todos os pacientes com HNSCC, especialmente aqueles que recebem terapia imunológica ativa (Turksma *et al.*, 2013).

#### 4.3.1 Anticorpos monoclonais

Para pacientes com HNSCC, o foco atual é em anticorpos direcionados ao recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), uma vez que em 90% dos HNSCC o EGFR é

superexpresso. O EGFR é um recetor da superfície celular com atividade de tirosina quinase e tem sido associado à proliferação, angiogénese e progressão através do ciclo celular do HNSCC. Os mAB contra EGFR ligam-se competitivamente ao recetor do EGFR inibindo assim o crescimento de células tumorais e aumentando a apoptose. Outro mecanismo pelo qual estes anticorpos exercem a sua ação é a partir da indução de ADCC através do recrutamento de células NK e macrófagos (Turksma *et al.*, 2013).

Os mAB contra o EGFR, como o Cetuximab, Panitumub, Nimotuzumab e Palutumumab, foram desenvolvidos para o HNSCC. Estes funcionam ligando-se ao domínio extracelular do EGFR e previnem a dimerização, a internalização e autofosforilação. Segundo estudos de qualidade moderada houve evidência que pode ocorrer uma redução de 18% nas mortes nos participantes tratados com terapias de mAB anti-EGFR, além das terapias padrão, e, num subgrupo que comparou mAB mais radioterapia com radioterapia sozinha mostrou algumas evidências de que a adição de terapia com mAB anti-EGFR à radioterapia resulta numa redução de 30% no número de participantes cuja doença progride. Porém, não houve evidência de que adicionar o mAB anti-EGFR à terapia padrão resulte numa diferença na qualidade de vida (Chan *et al.*, 2015).

#### **4.3.1.1 Cetuximab**

Até à introdução de agentes de imunoterapia, o primeiro e único agente a ser aprovado pela FDA para o HNSCC nos EUA foi o mAB Cetuximab (Moskovitz *et al.*, 2018).

O Cetuximab foi aprovado para o HNSCC em 2006 depois de ensaios iniciais de fase III terem demonstrado que este fármaco melhorou a resposta à quimioterapia e reduziu o risco de morte em pacientes com toxicidade cutânea associada ao Cetuximab. Estudos posteriores mostraram que a quimioterapia com Cetuximab acrescida de platina aumenta a sobrevida global e livre de progressão e que a sobrevida em 5 anos é melhorada em pacientes que receberam quimiorradioterapia e que desenvolveram erupção cutânea de grau  $\geq 2$  em resposta ao Cetuximab (Bann *et al.*, 2016; Bauman & Ferris, 2014). Também houve evidência de qualidade moderada de que a terapia com mAB anti-EGFR, nomeadamente Cetuximab, em combinação com radioterapia pode diminuir as falhas loco-regionais em 32% (Chan *et al.*, 2015).

O Cetuximab está aprovado em três aplicações específicas:

- I. Em combinação com radiação para HNSCC loco-regional avançado;

II. Como um agente único para HNSCC recorrente ou metástico após falha de quimioterapia baseada em platina;

III. Em combinação com quimioterapia baseada em platina mais 5-FU para a primeira linha de HNSCC recorrente ou metástico (Wen & Grandis, 2015).

Além de bloquear a sinalização de EGFR, o Cetuximab induz ADCC, maturação das DC e preparação-cruzada de linfócitos T citotóxicos específicos de EGFR, mecanismos imunes que poderiam ser aumentados pelo co-tratamento (Bauman & Ferris, 2014).

Além disso, também provoca a inibição da ativação do recetor de ligação-ligando natural, iniciação da endocitose do recetor, inibição da reparação de dupla fita de DNA que contribui para a resistência à radioterapia e quimioterapia indutora de dano ao DNA, impedindo a importação nuclear de EGFR (Wen & Grandis, 2015).

A radiação para os tumores aumenta a expressão de EGFR em células cancerígenas, permitindo que estas se tornem mais resistentes ao tratamento e, conseqüentemente, levando a resultados clínicos fracos. Com um agente como o Cetuximab, a inibição do EGFR deve aumentar os efeitos citotóxicos da radioterapia (Deng *et al.*, 2011).

Apesar do entusiasmo inicial sobre este agente-alvo, a adição de Cetuximab à quimioterapia baseada em platina resultou somente num aumento na sobrevida de 2,7 meses com apenas uma redução de 20% no risco relativo de morte. Esta resposta fraca é provável devido a múltiplas alterações sistémicas que são necessárias para a carcinogénese (Moskovitz *et al.*, 2018).

Embora o desenvolvimento de resistência ao Cetuximab seja bem reconhecido, os mecanismos subjacentes permanecem pouco esclarecidos (Ohnishi *et al.*, 2014).

Um estudo de Fase III mais recente com >800 pacientes descobriu que a adição de Cetuximab a regimes quimioradioterápicos baseados em platina não melhorou a sobrevida livre de progressão ou sobrevivência geral, sugerindo que a administração rotineira de Cetuximab pode não ser benéfica para todos os pacientes. Portanto, mais estudos são necessários para identificar os pacientes que são mais propensos a beneficiar da terapia com Cetuximab. Atualmente, existem mais de 80 ensaios clínicos a decorrer examinando o uso de Cetuximab para vários tipos de cancro, incluindo quatro ensaios para o HNSCC (Bann *et al.*, 2016).

Entretanto, o Cetuximab demonstrou modestas taxas de resposta quando usado como monoterapia (Economopoulou *et al.*, 2015).

Em relação aos efeitos secundários, houve evidência de que a adição de Cetuximab à terapia padrão pode resultar num aumento da toxicidade cutânea e erupção cutânea (Chan *et al.*, 2015).

A toxicidade mais comum e mais significativa é a erupção papulopustular, também conhecida como erupção acneiforme, que se desenvolve geralmente em zonas expostas ao sol ou sensíveis a cosméticos (Fakih & Vincent, 2010; Lacouture *et al.*, 2010).

A resistência aos medicamentos (intrínseca ou adquirida) é um dos principais desafios na terapia atual do HNSCC. Apesar da expressão difusa do EGFR, muitos tumores do HNSCC não respondem às terapias alvo do EGFR. Para ultrapassar esta resistência estão a ser testadas estratégias que incluem (mas não estão restritas a) a inibição de outras tirosina-quinases recetoras ou não recetoras, revogação de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)/VEGFR, inibição de mediadores a jusante na corrente de sinalização de EGFR e terapia génica. A identificação de biomarcadores preditivos para melhorar a seleção de pacientes que provavelmente beneficiarão desses tratamentos dispendiosos provavelmente melhorará os resultados. Um dos principais obstáculos é a heterogeneidade genética do cancro, incluída no HNSCC (Schmitz *et al.*, 2014; Wen & Grandis, 2015).

#### **4.3.1.2 Anticorpos monoclonais em estudo**

Em investigação no HNSCC encontra-se o Nimotuzumab, um anticorpo anti-EGFR com um padrão de ligação diferente de outros anticorpos anti-EGFR. Para a fixação estável na superfície celular, o Nimotuzumab requer duas moléculas de EGFR nas proximidades. Portanto, especialmente as células com níveis mais elevados de expressão de EGFR são mais frequentemente reconhecidas do que as células com um nível de expressão mais baixo. Assim, o Nimotuzumab, liga-se preferencialmente às células do HNSCC e apenas em menor extensão às células epiteliais normais (Hartmann & Grandis, 2016).

Outro agente a ser testado no HNSCC em combinação com quimioterapia, é o Bevacizumab, um anticorpo contra o VEGF humanizado. O alvo VEGF é responsável pela indução da angiogénese através da sua ligação a recetores presentes nas células endoteliais vasculares. A angiogénese é de vital importância para o tumor logo ao ser bloqueada a ligação VEGF ao recetor VEGF, o anticorpo inibe a angiogénese e diminui a permeabilidade microvascular com consequentes efeitos anti-tumorais (Turksma *et al.*, 2013).

### **4.3.2 Citocinas**

As citocinas desempenham um papel importante na manutenção do equilíbrio correto do sistema imunológico uma vez que o microambiente tumoral do HNSCC é caracterizado pelo favorecimento de citocinas imunossupressoras sobre citocinas estimulantes imunológicas que promovem o escape imune de células tumorais. No caso da IL-10, pode funcionar como um supressor imunológico, enquanto as citocinas, como IL-2 e IL-12, promovem o crescimento de células T. A citocina mais investigada para imunoterapia é a IL-2 que promove a expansão clonal específica de antígeno das células T e potencializa a atividade das células NK. No entanto, administrada em altas doses pode ser tóxica e induzir a expansão de Treg, resultando na supressão dos linfócitos circundantes (Turksma *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2017).

Segundo Turksma *et al.*, (2013), doses baixas de IL-2 foram usadas e testadas num ensaio de Fase III onde pacientes com HNC receberam quimioterapia em monoterapia ou em combinação com baixas doses de IL-2. No entanto, neste estudo, não foram encontradas diferenças entre os dois tipos de tratamento.

Porém a libertação peri-tumoral de IL-2 em pacientes com HNSCC ressecável aumentou as células NK periféricas e aumentou a citotoxicidade das células T dentro do tumor. Um estudo randomizado de Fase III foi realizado para avaliar o benefício clínico da adição de IL-2 peri-linfática à cirurgia e radiação no HNSCC avançado ressecável. A injeção de IL-2 nos gânglios linfáticos cervicais foi bem tolerada e não resultou em complicações significativas. A análise multivariada mostrou que a adição da terapia com IL-2 aumentou significativamente a sobrevida livre de doença e global. Estes e outros estudos subsequentes mostraram que a libertação local, peri-tumoral ou peri-linfática, da IL-2 tem atividade para aumentar a resposta imune no local do tumor (Xie *et al.*, 2017).

Relativamente à IL-12, o aumento dos seus níveis locais através de um vetor plasmídico exógeno pode facilitar a eliminação do tumor pelo sistema imunitário e estudos atuais estão a examinar a eficácia da IL-12 administrada como preparações lipossómicas ou plasmídicas para o HNSCC (Bann *et al.*, 2016).

Em vez de uma única citocina recombinante como a IL-2 e IL-12, surge uma nova abordagem na investigação que consiste numa mistura de citocinas denominadas IRX-2 incluindo IL-1 $\beta$ , IL-2, 1 IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF e IFN- $\gamma$  (Bann *et al.*, 2016; Schutt *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2017).

Estudos pré-clínicos mostraram que este cocktail de citocinas é ativo em vários tipos de células imunes, induzindo a maturação das DC, a ativação de células T e a estimulação de células NK. Estudos de fase I e II demonstraram que o IRX-2 é seguro e geralmente bem tolerado, embora alguns pacientes possam desenvolver efeitos adversos potencialmente graves, incluindo anemia e linfopenia (Bann *et al.*, 2016).

Num ensaio clínico de Fase II, o IRX-2 em combinação com os adjuvantes imunológicos ciclofosfamida, indometacina e suplementação de zinco foi administrado no pré-operatório por 21 dias em pacientes com HNSCC previamente não tratado, ressecável e localmente avançado. Um ensaio de IRX-2 administrado antes da cirurgia a 27 pacientes previamente não tratados com HNSCC de estadios II a IV mostrou-se muito promissor. O IRX-2 apresentou toxicidade aguda mínima. Impressionantemente, 16% dos pacientes tinham respostas tumorais e 74% dos pacientes tinham diminuído ou estabilizado as dimensões antes da cirurgia definitiva (Schutt *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2017).

Além disso, um estudo de Fase II de 42 pacientes com HNC tratados com IRX-2 mais quimiorradioterapia demonstrou maior sobrevida geral e maior tempo de recorrência em comparação com os controlos contemporâneos fora do estudo. O tratamento com IRX-2 foi associado com melhoria sintomática em 57% dos pacientes, sugerindo que o IRX-2 pode ser um tratamento eficaz para aumentar a eficácia da quimiorradioterapia tradicional e da cirurgia para HNC (Bann *et al.*, 2016).

### **4.3.3 Inibidores do *Checkpoint* Imunológico**

Os anticorpos anti-CTL-4 e anti-PD-1 surgiram como novos agentes imunoterapêuticos mostrando uma atividade clínica substancial em vários tipos de cancro, incluindo no HNSCC (Economopolou *et al.*, 2017).

Dogan *et al.*, (2017) constataram que numerosos ensaios clínicos estão a abordar a adequação e eficácia dos moduladores do *checkpoint* imunológico no HNSCC, com os alvos predominantes como os recetores PD-1/PD-L1 e CTLA-4. Recentemente, os resultados apresentados mostraram um benefício de sobrevida, um perfil de segurança favorável e uma duração estendida de resposta em favor do uso da modulação do *checkpoint* do sistema imunológico no HNSCC recorrente/metástico.

Contudo, apenas uma minoria de pacientes obtém benefício da imunoterapia como um único agente (Economopolou *et al.*, 2017).

Além disso, a percentagem de pacientes que respondem ao bloqueio do recetor do *checkpoint* imunológico ainda é insatisfatória e a resistência não é incomum, portanto, a compreensão dos mecanismos imunológicos permitirá ao clínico seleccionar adequadamente os pacientes que serão beneficiados com essa terapia e excluir aqueles que se sujeitariam apenas aos efeitos colaterais autoimunes. A avaliação de PD-L1 e IFN- $\gamma$  pode representar uma maneira de determinar a presença de TIL, bem como fornecer um método para prever a resposta do paciente à imunoterapia (Moskovitz *et al.*, 2018).

Embora muitos destes tratamentos estejam a ser usados com resultados encorajadores numa variedade de malignidades diferentes, parece haver algumas diferenças nos padrões de resposta e toxicidades, que podem ser específicos da doença ou da população, até certo ponto. Estudos estão a ser realizados para identificar biomarcadores confiáveis. Até à data, apesar do uso comum de PD-L1 como biomarcador, o consenso em métodos de deteção, a definição de positividade e o seu uso como biomarcador prognóstico ou preditivo é deficiente (Sadraei *et al.*, 2016).

#### **4.3.3.1 Agentes inibidores aprovados**

Os agentes anti-PD-1, Nivolumab e Pembrolizumab, foram recentemente aprovados pela FDA como um padrão de tratamento para pacientes com HNSCC recorrente/metastático refratário à platina. As vias moleculares que levam à resistência começam a ser identificadas, e, investigações estão a decorrer para entender o regime de tratamento mais ideal com incorporação de imunoterapia (Dogan *et al.*, 2017; Moskovitz *et al.*, 2018).

Antes da sua recente aprovação, o Pembrolizumab era apenas aprovado como monoterapia para melanoma metastático e cancro do pulmão de células não pequenas (NSCLC) metastático. O Pembrolizumab mostrou-se promissor para o HNSCC em vários estudos. Especificamente, num estudo composto por pacientes com HNSCC, demonstraram uma taxa de resposta geral de 18,2% e uma taxa de controlo da doença de quase 50%. Além disso, o Pembrolizumab foi melhor tolerado do que a quimiorradioterapia agressiva, com os efeitos adversos mais comuns sendo fadiga, hipotireoidismo, diminuição do apetite e erupção cutânea (Bann *et al.*, 2016).

Num estudo aberto de Fase Ib, pacientes com HNSCC recorrente/metastático refratário à platina com células tumorais PD-L1+ foram tratados com Pembrolizumab e obtiveram uma taxa de resposta com percentagens significativas. Além disso, pacientes com HNSCC com células tumorais PD-L1+ tiveram uma taxa de resposta claramente

maior do que pacientes com PD-L1-. Um estudo randomizado de Fase III foi iniciado para comparar o Pembrolizumab com a escolha do investigador do tratamento padrão (Metotrexato, Docetaxel ou Cetuximab) para o HNSCC recorrente/metastático refratário à platina, com sobrevida livre de progressão como *endpoint* primário. Noutro estudo randomizado de Fase III, Pembrolizumab isolado ou Pembrolizumab + platina/5-FU estão a ser comparados ao esquema de tratamento padrão de Cetuximab + platina/5-FU para tratamento de primeira linha de HNSCC recorrente/metastático. Os *endpoints* primários são sobrevida livre de progressão e sobrevida global em todos os pacientes, bem como análise de subconjunto limitada a pacientes PD-L1+. Outros estudos clínicos estão a decorrer para avaliar o Pembrolizumab em combinação com quimioterápicos padrão e/ou radioterapia noutras populações de HNSCC (Xie *et al.*, 2017).

Semelhante ao Pembrolizumab, o Nivolumab é um mAB humanizado anti-PD-1 que era aprovado pela FDA apenas para o tratamento de carcinoma de células renais, NSCLC e melanoma até 2016 (Bann *et al.*, 2016).

O Nivolumab foi extensivamente avaliado no HNSCC. Um dos estudos foi um ensaio clínico randomizado de Fase III que compara o Nivolumab com outra terapia à escolha do investigador no HNSCC recorrente/metastático refratário à platina. Este estudo foi precocemente interrompido uma vez que atingiu o seu *endpoint* primário e demonstrou uma sobrevida global superior e uma redução de 30% no risco de morte no Nivolumab em comparação com a escolha do investigador. Um estudo de Fase III que decorre está a avaliar a quimiorradioterapia baseada em cisplatina +/- Nivolumab em pacientes recém-diagnosticados, de risco imediato, com HNSCC avançado (Xie *et al.*, 2017).

#### 4.3.3.2 Agentes inibidores em estudo

O ligando para PD-1, PD-L1, é superexpresso em células do HNSCC e oferece uma estratégia alternativa para desengatar o *checkpoint* imune PD-1/PD-L1. Durvalumab e Avelumab são mAB anti-PD-L1 e foram avaliados em vários ensaios clínicos para o HNSCC. Num ensaio de Fase I/II, o Durvalumab foi relatado como tendo uma taxa de resposta de 11%, com 6 pacientes atingindo resposta com duração superior a 12 meses. O Avelumab mostrou atividade promissora num ensaio de Fase I para apoiar o início de um estudo de Fase III randomizado e fundamental para avaliar a quimiorradioterapia +/- Avelumab à base de cisplatina como primeira linha nos HNSCC recém-diagnosticados localmente. O *endpoint* primário neste estudo é a sobrevida livre de progressão e o *endpoint* secundário é a sobrevida global. Atualmente, não está esclarecido se o alvo PD-

L1 será superior ao alvo PD-1. Contudo, os dados deste teste fornecerão uma percepção inicial para abordar essa questão em aberto (Xie *et al.*, 2017).

Em geral, o perfil de efeitos colaterais associado ao bloqueio de PD-1 e PD-L1 tem sido favorável. Os efeitos colaterais típicos da quimioterapia citotóxica, como náuseas e citopenias, estão quase ausentes. O efeito colateral mais comum destes agentes é a fadiga. Embora exista uma preocupação para uma toxicidade imuno-mediada significativa em tecidos normais, que no caso de outros inibidores de *checkpoint*, como o Ipilimumab, incluindo casos de colite grave, pneumonite, hepatite, hipofisite e dermatite, estes eventos ocorrem em menos de 5% de pacientes (com todos os tipos de cancro) que recebem inibidores de PD-1 ou PD-L1 (Bauml *et al.*, 2016).

O CTLA-4 é outra via inibitória imune que pode levar à inativação das células T. O CTLA-4 compete com o CD28, um recetor estimulador, para se ligar ao ligando B7 nas APC para controlar a proliferação das células T. O bloqueio do envolvimento de CTLA-4 com B7 libertará B7 nas APC para se ligarem ao recetor CD28 em células T de forma a aumentar a proliferação de células T e a resposta imunitária anti-tumoral. Os anticorpos anti-CTLA-4, como o Ipilimumab e o Tremelimumab estão a começar a ser avaliados no HNSCC. Um estudo de Fase Ib está a decorrer para determinar a segurança da adição prévia de Ipilimumab ao concorrente Cetuximab + radioterapia modificada de intensidade em pacientes com HNSCC localmente avançado não tratado (Xie *et al.*, 2017).

Novos agentes farmacológicos que têm como alvo outros *checkpoint* imunológicos e recetores co-estimulatórios, incluindo CTLA4, OX40, 4-1BB, LAG-3 e HLA-E, estão atualmente a ser avaliados numa ampla variedade de tumores, incluindo o HNSCC. Além disso, estão a ser exercidos esforços significativos para avaliar combinações de inibidores do *checkpoint* imunológico com uma variedade de outras terapias antineoplásicas, incluindo radiação, cirurgia e quimioterapia citotóxica (Bauml *et al.*, 2016).

As imunoterapias combinadas representam um passo fundamental no progresso no sentido de melhorar as respostas, e os inibidores do *checkpoint* imunológico provavelmente tornar-se-ão a estrutura imunoterapêutica de futuros tratamentos contra o cancro (Economopolou *et al.*, 2017).

#### **4.3.4 Transferência Celular Adotiva**

Vários estudos sobre a terapia adotiva das células T já foram/estão a ser realizados. No entanto, nenhum estudo até ao momento relatou os resultados da ACT para o HNSCC relacionado com o HPV. Num dos estudos que está a decorrer os pacientes são submetidos

a um transplante autólogo de células estaminais usando células T transduzidas com um recetor de células T E6 (Bauml *et al.*, 2016).

Uma das técnicas existentes é a ACT com TIL, uma abordagem em que células T, geralmente uma mistura de células T CD8 + e CD4 + que cresceram a partir de depósitos tumorais metastáticos ressecados, são colhidas e expandidas *ex vivo* antes da transferência adotiva. Esta abordagem tenta reverter o comprometimento funcional das células T específicas que residem no tumor, e, causadas pelo microambiente tumoral imunossupressor, cultivando-as antes da reinfusão numa mistura de várias citocinas (Farkona *et al.*, 2016).

Esta forma de imunoterapia é considerada bastante eficaz uma vez que tem mostrado induzir a regressão do cancro em 50-70% dos pacientes com melanoma metastático. Em 2009 foi então estudada esta terapia promissora no HNSCC. Um dos estudos tinha o intuito de avaliar a resposta imune a TIL como tratamento adjuvante para HNC após cirurgia e radioterapia antecedente. Os pacientes recebem um único tratamento de quimioterapia, infusão intravenosa de um grande número de TIL expandidos *in vitro*, seguidos de baixas doses de IL-2. O estudo mostrou que os TIL poderiam ser expandidos em 80% dos pacientes em 17 dias. Uma vez que a infeção pelo vírus do HPV de alto risco está associada ao HNSCC e as proteínas virais E6 e E7 são especificamente expressas pelas células tumorais, estas são ideais para a ACT (Schutt *et al.*, 2012).

Os esforços em curso visam não só melhorar a terapia com TIL, mas também ampliar os TIL para combater malignidades. Avanços nos métodos de cultura de células T e engenharia de células T genéticas garantem que números clinicamente relevantes de células T específicas de tumores possam ser gerados e administrados como terapia de uma maneira oportuna (Farkona *et al.*, 2016).

Existem duas estratégias básicas que estão a ser exploradas em ensaios clínicos de células T fabricadas: o TCR e o CAR, que são fundamentalmente diferentes nas suas estruturas e nas estruturas que reconhecem (Figura 9) (Farkona *et al.*, 2016; Rosenberg & Restifo, 2015).

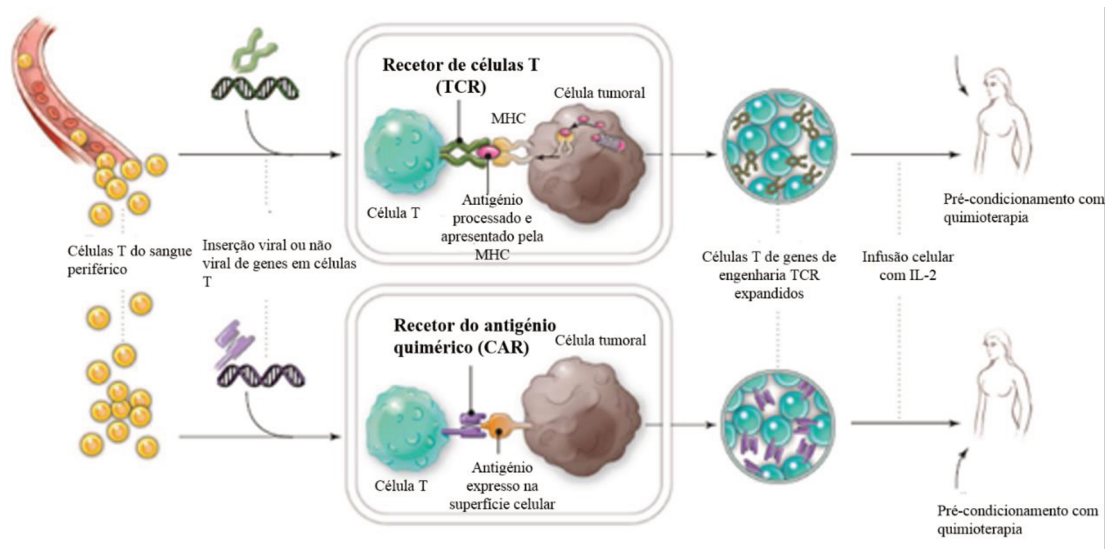


Figura 9 - Modificação genética dos linfócitos do sangue periférico (Adaptada de Rosenberg & Restifo, 2015)

Relativamente à estratégia TCR, foi recentemente demonstrado que os linfócitos CD4+ específicos de E6/E7 poderiam ser gerados *in vitro* pela introdução de TCR específicos de HPV16 E6/E7 em células CD4+ circulantes. Estes resultados indicam que a transferência de TCR é uma técnica promissora para gerar linfócitos CD4+ específicos para HPV16 *ex vivo* que poderiam ser adotivamente transferidos para pacientes que sofrem de tumores induzidos por HPV16, incluindo o cancro do colo do útero e HNSCC (Schutt *et al.*, 2012).

Em relação à estratégia CAR, o campo da terapia adotiva de células T foi transformado por esta tecnologia emergente, que permite maior precisão no ataque das células T. Os vírus HPV e EBV são ambos alvos prováveis para futuros testes de CAR (Bauml *et al.*, 2016).

A terapia com CAR foi explorada em vários tipos de tumores e pode ser usada no tratamento de HNC (Ishii *et al.*, 2015; Schoenfeld, 2015).

Embora os dados específicos para o HNC sejam atualmente limitados, as células T podem ser projetadas com especificidade para o EGFR. Ainda que potencialmente eficazes, as células T CAR com uma afinidade muito grande para o EGFR têm efeitos colaterais prejudiciais, dada a expressão generalizada do EGFR (Schoenfeld, 2015). Além disso, apesar dos CAR terem sido bem-sucedidos no tratamento de neoplasias hematológicas e provavelmente se juntem em breve ao tratamento oncológico recorrente, a capacidade de tratar cancros epiteliais sólidos comuns, que correspondem a 90% de

todas as fatalidades cancerígenas, é severamente limitada pela falta de alvos adequados exclusivos para o cancro (Rosenberg & Restifo, 2015).

Outro método com a possibilidade de ser uma imunoterapia efetiva seria a indução da atividade das células NK em pacientes com HNSCC. Direcionar células tumorais especificamente pode ser uma técnica mais eficaz de ACT e pode ser realizado por transferência adotiva de células T geneticamente modificados para expressar recetores anti-tumorais de células T. Tais estratégias também podem ser aplicáveis a pacientes com tumores epiteliais comuns de difícil ressecção. Essa técnica pode ser especialmente adequada para tumores HPV+, uma vez que pode ser direcionada contra as proteínas virais E6 e E7, que são necessárias para que as células tumorais mantenham o seu fenótipo maligno. Vários recetores de células T específicas para HPV foram isolados e testados *in vitro* (Turksma *et al.*, 2013).

Oportunidades para melhorar a ACT envolvem a identificação e o desenvolvimento de células T anti-tumorais específicas com as propriedades funcionais ideais para a destruição do tumor. A ACT é uma abordagem mais complexa para o tratamento do cancro do que muitos outros tipos de imunoterapia e tem sido criticada como impraticável e muito dispendiosa para uma aplicação generalizada (Rosenberg & Restifo, 2015).

#### **4.3.5 Vacinas**

As vacinas contra o cancro são projetadas para ativar o sistema imune adaptativo através da apresentação de TA, TSA ou TAA, por APC. Vacinas direcionadas a TSA são preferidas, uma vez que o antigénio será específico para as células tumorais e, assim, a reação autoimune às células normais pode ser evitada. As vacinas direcionadas a TSA podem ser aplicáveis apenas a um pequeno subconjunto de HNSCC devido ao facto de que em particular o HNSCC associado ao HPV-, apresenta um vasto cenário mutacional. As vacinas direcionadas a TAA podem ter aplicações mais amplas. No entanto, várias limitações foram relatadas, incluindo fraca imunogenicidade e autotolerância (Xie *et al.*, 2017).

Têm sido testadas vacinas estrategicamente contra o cancro que podem ser descritas na Tabela 7 (Xie *et al.*, 2017).

Tabela 7 - Vacinas testadas contra o cancro (Adaptada de Xie *et al.*, 2017)

|  |   |
|--|---|
| <b><i>Vacinas de proteínas</i></b>                 | <ul style="list-style-type: none"><li>• Fáceis de produzir;</li><li>• Têm como objetivo atingir TSA;</li><li>• Desvantagens: Proteólise do hospedeiro, imunogenicidade fraca, restrição de TA e imunidade de curta duração.</li></ul> |
| <b><i>Vacinas baseadas em DNA</i></b>              | <ul style="list-style-type: none"><li>• Mais estáveis que as vacinas proteicas:</li><li>• Têm um conjunto distinto de limitações, como o uso limitado de APC e um número limitado de TA para atingir o alvo.</li></ul>                |
| <b><i>Vacinas baseadas em vetor</i></b>            | <ul style="list-style-type: none"><li>• Melhor antigenicidade que as vacinas de DNA devido a um efeito cruzado da resposta inflamatória vigorosa contra antigénios vectoriais.</li></ul>  |
| <b><i>Vacinas de células tumorais</i></b>          | <ul style="list-style-type: none"><li>• Poderia teoricamente apresentar um conjunto completo de TAA, no entanto, são pouco imunogénicas.</li></ul>  |
| <b><i>Vacinas de DC ativadas por proteínas</i></b> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Receberam um interesse considerável devido à forte reação de imunidade induzida pelas DC fabricadas.</li></ul>  |

Vários ensaios de vacinas contra o HNSCC foram realizados, embora com um pequeno número de pacientes. Estes estudos preliminares realizados com DC ativadas por proteínas, vacinas de proteínas e vacinas com linfócitos T citotóxicos apresentaram resultados positivos e encorajadores, no entanto, ainda insuficientes e pouco claros para demonstrar como as vacinas contra o HNSCC devem ser integradas (Xie *et al.*, 2017).

Um dos principais obstáculos para o desenvolvimento de vacinas bem-sucedidas contra o cancro é a identificação dos antigénios mais adequados para o seu uso (Farkona *et al.*, 2016).

Logo, é necessário um melhor entendimento das interações entre o hospedeiro e o tumor e os mecanismos de escape imune do tumor para desenvolver vacinas eficazes contra o cancro. A identificação de um biomarcador imunológico como um único gene tumoral ou de produtos proteicos responsáveis pela transformação de células normais em células tumorais e promoção da progressão do cancro também revelará novos alvos potenciais para a terapia com vacinas (Guo *et al.*, 2013).

#### **4.3.5.1 Vacinação e o HPV**

As vacinas terapêuticas são destinadas ao tratamento de células infetadas por HPV, e isso pode ser conseguido através da indução de uma resposta imune celular induzida por células T que pode reconhecer e eliminar essas células (Economopoulou *et al.*, 2015).

Tendo sido já aprovadas pela FDA, as vacinas Cervarix e Gardasil para a prevenção do cancro do colo do útero associado ao HPV, surge a oportunidade de tratamento altamente potencial do HNSCC. Estas vacinas merecem uma avaliação cuidadosa para prevenir a infeção e como ferramentas terapêuticas para o controlo de recorrência loco-regional do HNSCC e doença metástica associado ao HPV (Schutt *et al.*, 2012).

Uma compreensão da progressão molecular do cancro associado ao HPV levou à conclusão de que as proteínas E6 e E7 do HPV são alvos úteis para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas para o HPV. As onco-proteínas virais são expressas precocemente no curso da infeção e têm papéis multifuncionais na oncogénese (Bann *et al.*, 2016). Estas proteínas virais estrangeiras são mais imunogénicas do que uma auto-proteína superexpressa em células cancerígenas. Além disso, são continuamente expressas por todas as células infetadas pelo vírus (Economopoulou *et al.*, 2015).

Ao contrário de muitos outros potenciais alvos de vacinas, as proteínas E6 e E7 são exógenas, conseqüentemente, pode ser mais fácil superar a tolerância imunológica e gerar uma resposta imune anti-tumoral. Além disso, seria de esperar que qualquer reação imunitária dirigida contra estes antígenos poupasse o tecido hospedeiro normal. Estas proteínas oncogénicas associadas a vírus tendem a ser relativamente conservadas em torno de cancros individuais, dada a sua importância na oncogénese. Esta conservação relativa em epítomos está em contraste com mutações mais variáveis e pleiotrópicas que estão presentes em oncogenes de malignidades não direcionadas por vírus (Schoenfeld, 2015).

Segundo Bann *et al.* (2016) estão em estudo vacinas baseadas em DNA como a INO-3112 que consiste na combinação de duas vacinas originalmente desenvolvidas para tratamento do cancro do colo do útero. Os plasmídeos de expressão contidos na vacina, produzem as proteínas E6 e E7 do HPV, resultando numa resposta de células T CD8+ específicas para HPV. Esta vacina é apropriada apenas para HPV+ com HNSCC e está a ser testada em ensaios de fase I/II. Também em estudo no HNSCC estão as vacinas peptídicas Mucin-1 e a AlloVax em ensaios de fase I/II e a ISA101 e ISA201 (HESPECTA) em ensaios para HPV+.

Terapias combinadas estão a ser testadas em ensaios clínicos e provavelmente será a melhor abordagem para melhorar os resultados clínicos e a qualidade de vida daqueles com cancro associado ao HPV através do aumento sinérgico da imunidade anti-tumoral

e/ou aplicação de respostas anti-tumorais complementares (Butterfield, 2015; Guo *et al.*, 2013).

Outra proteína característica dos cancros associados ao HPV é a proteína celular superexpressa p16. Como esta proteína é preferencialmente expressa em tumores, a p16 é um alvo de vacina interessante. Um ensaio clínico está a avaliar a quimioterapia baseada em cisplatina combinada com a vacinação peptídica p16<sub>37-63</sub> em pacientes com cancros com HPV+. Inibidores do *checkpoint* imunológico em combinação com abordagens baseadas em vacinas foram avaliadas no cenário pré-clínico e serão introduzidos em ensaios com casos metastáticos, refratários e recorrentes. À medida que adquirimos uma maior compreensão da interação de vias imunes complexas, essas terapias de combinação serão críticas como uma abordagem multifacetada para abordar o microambiente tumoral (Bann *et al.*, 2016).

#### **4.3.6 Vírus oncolíticos**

Muitos vírus têm sido propostos como vetores para imunoterapia com vírus oncolíticos, e um trabalho considerável tem sido feito para otimizar vetores virais atenuando a patogenicidade e aumentando a imunogenicidade (Kaufman *et al.*, 2015). Os vírus oncolíticos representam uma nova abordagem para a terapia do cancro que utiliza vírus recombinantes ou manipulados para destruir seletivamente as células tumorais. Além disso, a lise das células tumorais liberta TSA no ambiente circundante juntamente com antigénios virais, o que pode facilitar a produção de uma resposta imune anti-tumoral. Atualmente, dois vírus oncolíticos, o Pexa-Vec (JX-594) e o TRICOM estão a ser submetidos a ensaios clínicos para o tratamento do HNSCC (Bann *et al.*, 2016).

O protótipo dos vírus oncolíticos eram adenovírus, mas, apesar da engenharia genética encarregue do aumento da seletividade do tumor, estes vírus têm sido problemáticos devido à infeção inadequada de células cancerígenas, falta de especificidade e à resposta imunológica vigorosa do anticorpo antiadenoviral. ONYX 015 foi o primeiro vírus oncolítico de engenharia *in vivo* avaliado em humanos e, embora as respostas tenham sido decepcionantes, um agente semelhante foi licenciado na China para o tratamento de HNC em combinação com quimioterapia (Donnelly *et al.*, 2013).

Têm sido desenvolvidos adenovírus oncolíticos que se replicam preferencialmente em tumores, resultando na destruição de células tumorais. Um exemplo é o herpes simplex oncolítico como o HF10, que está a ser desenvolvido para direcionar casos de HNC (Chan *et al.*, 2015).

Segundo Donnelly *et al.*, (2013) numerosos ensaios de fase inicial de seis vírus oncolíticos foram relatados sem evidência de toxicidade preocupante, quer quando relatados como únicos agentes ou em combinação com quimioterapia e radioterapia. Três dos vírus oncolíticos atingiram testes aleatórios em pacientes com cancro onde está incluída a reolisina para o tratamento do HNC.

Embora promissora, existem limitações associadas à terapia oncolítica. Por exemplo, pacientes imunocomprometidos podem não ser bons candidatos porque a imunidade anti-tumoral mediada por vírus oncolíticos pode estar comprometida nesses pacientes. O facto de os vírus oncolíticos serem injetados localmente no tumor para evitar a imunidade antiviral preexistente também é considerado uma limitação porque, nesse caso, o vírus pode não atingir tumores em órgãos que são difíceis de alcançar com uma injeção. Portanto, e dada a natureza disseminada do cancro metastático, acredita-se que a administração sistémica possa ser mais efetiva. Apesar das restrições, a terapia do vírus oncolítico demonstrou uma relação risco-benefício favorável e sua aprovação pelo FDA é um marco considerável no campo (Farkona *et al.*, 2016).

## **4.4 Considerações Futuras**

### **4.4.1 Prevenção do cancro oral**

Existe agora uma compreensão adequada das causas que podem contribuir para a prevenção do HNSCC e há informação suficiente para permitir a deteção precoce e o tratamento eficaz. Para o cancro oral, há evidências de que o exame visual como parte de um programa de rastreamento populacional pode identificar tumores num estadio inicial e assim reduzir a morbidade e mortalidade associadas à deteção tardia dos carcinomas. No entanto, isto é dificultado pela falta de procura da consulta regular de medicina dentária por grupos de alto risco (Farah *et al.*, 2014).

Surge assim a necessidade de alertar as populações para uma mudança no seu estilo de vida e impor barreiras aos fatores desencadeantes em pacientes de alto risco. Através da educação, da população em geral e dos grupos de risco em particular, sobre a importância das consultas de medicina dentária e os principais comportamentos de prevenção do cancro oral, como proteção solar e cessação tabágica, a diminuição significativa dos números alarmantes que acompanharam esta doença nas décadas recentes deverá ocorrer (Rivera, 2015).

### **4.4.2 A imunoterapia conjugada com outros tratamentos**

Estando o HNSCC já instalado, acredita-se que a terapia imunológica se possa, num futuro próximo, conjugar aos tratamentos convencionais que existem para o tratamento deste pelas seguintes razões:

I. Pode desfazer a massa tumoral enquanto destrói o tumor por meio de uma resposta celular. Isso permite diminuir a morbidade durante o tratamento secundário e também fornece o controlo direto local e regional do tumor;

II. Deve ser capaz de controlar as lesões satélites e micro-metástases mais eficazmente devido à sua natureza mais específica para as células. Esta destruição de células deve aumentar a sobrevida e permitir a diminuição dos níveis de quimioterapia para conseguir uma resposta igual;

III. A resposta imune sistémica criada pela imunoterapia pode ajudar a atingir a metástase à distância. Esta fase é atualmente muito dificilmente tratável e tem um mau prognóstico;

IV. A possível ativação de respostas de memória poderá levar a uma necessidade urgente de imunossupressão tumoral a longo prazo, reduzindo assim a incidência de recaídas (Schutt *et al.*, 2012).

Além disso, apenas uma minoria de pacientes com cancro avançado consegue responder à imunoterapia com um único agente. Pensa-se que, apenas com a combinação de múltiplas abordagens terapêuticas se consegue alcançar a remissão completa e cura de pacientes com cancro. Este campo está progredindo rapidamente ao ponto de novas combinações estarem a ser avaliadas quase mensalmente (Farkona *et al.*, 2016; Moskovitz *et al.*, 2018).

Deve-se notar, também, que as imunoterapias frequentemente produzem um perfil de resposta que muitas vezes é significativamente diferente do associado à quimioterapia tradicional. De facto, muitos agentes imunoterapêuticos requerem uma perda de tempo mais longa para se conseguir uma resposta clínica e podem mesmo induzir uma pseudo-progressão do tumor, quando comparados com as abordagens quimioterapêuticas tradicionais. No caso de comprometimento de estruturas críticas, a técnica cirúrgica inicial pode desempenhar um papel importante para pacientes com HNSCC tratados com imunoterapia (Bann *et al.*, 2016).

#### **4.4.3 Particularidades da terapia imunológica**

Assim, a área de imunoterapêutica com a capacidade de identificar, *a priori*, quais os pacientes com HNSCC que provavelmente beneficiarão de uma abordagem imunoterapêutica particular necessita de um estudo adicional. De facto, para muitos agentes, apenas um subconjunto de doentes responde a qualquer terapia, provavelmente devido a variações no subtipo de MHC ou outras proteínas imunomoduladoras. Além disso, o perfil de expressão genética e mutacional específico de um determinado tumor pode também ter impactos significativos na eficácia da imunoterapia (Bann *et al.*, 2016).

É importante também a descoberta de biomarcadores específicos desta doença, o que deve permitir avanços sobre novos fatores etiológicos e a sua interação (Rivera., 2015).

Os ensaios clínicos da imunoterapia atual têm como objetivo definir o regime adequado com a menor toxicidade e com respostas duráveis (Moskovitz *et al.*, 2018).

No entanto, para o HNSCC, o regime imunoterapêutico mais eficaz ainda está por definir.

Certas estratégias são consideradas mais promissoras, que é o caso da imunoterapia dirigida a células cancerígenas que expressam TSA, tal como os agentes anti-PD-1, que apresentam efeitos limitados no tecido normal (Wen & Grandis, 2015).

Outra aplicação potencial de agentes imunoterapêuticos é a prevenção do HNSCC através da vacinação de pacientes selecionados de alto risco. No caso de cancro associado ao HPV, a vacinação contra estipes de HPV de alto risco resulta numa clara redução na incidência de cancro do colo do útero e tem o potencial de prevenir mais de 90% dos HNC com HPV+ (Bann *et al.*, 2016).

## 5. Conclusões

O cancro oral é uma neoplasia que afeta o organismo do ponto de vista estético e funcional, o que consecutivamente se manifesta na qualidade de vida dos pacientes. Sendo uma doença que frequentemente é identificada já num estado avançado, aspetos como a morbilidade e mortalidade estão bastante presentes.

Até recentemente, o tratamento do cancro cingia-se aos tratamentos convencionais como a cirurgia, radioterapia e quimioterapia que, infelizmente, já não são eficazes para o HNSCC avançado/metástico. Porém, devido à evolução científica e à compressão do sistema imunológico e a sua interação com os tumores, surge uma nova terapia, a imunoterapia. A imunoterapia consiste na estimulação do sistema imunitário aumentado a resposta anti-tumoral e diminuindo os mecanismos supressores do tumor.

Sendo uma terapia já bastante aplicada em diversas patologias neoplásicas, como o melanoma, onde há evidência de melhores resultados clínicos com menos efeitos colaterais, e, com uma grande necessidade de melhores tratamentos para o cancro oral, estudos são desenvolvidos com o objetivo de aplicar esta nova terapia em pacientes com HNSCC.

Dos diversos campos de imunoterapia explorados (mAB, inibidores de *checkpoint* imunológico, citocinas, ACT, vacinas e vírus oncolítico) vários fármacos são assim aprovados, como o mAB Cetuximab e os inibidores de *checkpoint* imunológico Pembrolizumab e Nivolumab e muitos outros encontram-se em estudo.

No entanto, devido provavelmente às distintas características genéticas de cada paciente, esta terapia nem sempre resulta porque não é específica o suficiente. E, ainda que a imunoterapia tenha apresentado alguns resultados clínicos favoráveis em monoterapia, a melhor terapia para qualquer cancro será a combinada.

Mais estudos são assim necessários para aperfeiçoar e aumentar a aplicação das diferentes áreas desta terapia como também para personalizar cada tratamento. A seleção de pacientes que beneficiem da imunoterapia se for possível futuramente trará com certeza melhores taxas de resposta.

Não menos importante que a procura da terapia mais eficaz contra o cancro oral, a prevenção é a chave para reduzir a sua incidência e prevalência e está nas mãos do médico dentista impedir a evolução destes tumores através do seu diagnóstico clínico.



## 6. Bibliografia

American Cancer Society (2016). What is cancer immunotherapy. Retrieved from <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/immunotherapy.html>

American Society of Clinical Oncology (2017). Understanding immunotherapy. Retrieved from <https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/how-cancer-treated/immunotherapy-and-vaccines/understanding-immunotherapy>

Andersen, A. S., Sjølling, A. S. K., Ovesen, T., & Rusan, M. (2014). The interplay between HPV and host immunity in head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 134(12), 2755–2763. <https://doi.org/10.1002/ijc.28411>

Arosa, F. A., Cardoso, E. M., Pacheco, F. C. (2007). *Fundamentos de Imunologia*. Lisboa: Lidel.

Bann, D. V., Deschler, D. G., & Goyal, N. (2016). Novel immunotherapeutic approaches for head and neck squamous cell carcinoma. *Cancers*, 8(10), 1–20. <https://doi.org/10.3390/cancers8100087>

Bauman, J. E., & Ferris, R. L. (2014). Integrating Novel Therapeutic Monoclonal Antibodies Into the Management of Head and Neck Cancer. *National Institute of Health*, 120(5), 624–632. <https://doi.org/10.1002/cncr.28380>

Bauml, J. M., Cohen, R. B., & Aggarwal, C. (2016). Immunotherapy for head and neck cancer: Latest developments and clinical potential. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 8(3), 168–175. <https://doi.org/10.1177/1758834016631529>

Bose, P., Brockton, N. T., & Dort, J. C. (2013). Head and neck cancer : from anatomy to biology. *International Journal of Cancer*, 133(9), 2013-23. <https://doi.org/10.1002/ijc.28112>

Butterfield, L. H. (2015). Cancer vaccines. *Bmj*, 1-14. <https://doi.org/10.1136/bmj.h988>

Chan, K. K. W., Glenny, A.M., Weldon, J.C., Furness, S., Worthington, H.V., & Wakeford, H. (2015). Interventions for the treatment of oral and oropharyngeal cancers: targeted therapy and immunotherapy (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Online), (12), 1-90. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010341.pub2>. [www.cochranelibrary.com](http://www.cochranelibrary.com)

Charles, B. F., Dana, K. A., Timothy, R. B., David, L. D. John, G. H. & Raphael, E. P. (2015). *Schwartz's Principles of Surgery*

Cruvinel, W. M., Júnior, D. M., Araújo, J. A. P., Catelan T. T. T., Souza, A. W. S., Silva, N. P., & Andrade, L. E. C. (2010). Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol*, 50(4), 434–461. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000400008>

Deng, H., Sambrook, P. J., & Logan, R. M. (2011). The treatment of oral cancer: An overview for dental professionals. *Australian Dental Journal*, 56(3), 244–252. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2011.01349.x>

Dogan, V., Rieckmann, T., Münscher, A., & Busch, C. J. (2017). Current studies of immunotherapy in head and neck cancer. *Clinical Otolaryngology*, 43(1), 13-21. <https://doi.org/10.1111/coa.12895>

Donnelly, O., Harrington, K., Melcher, A., & Pandha, H. (2013). Live viruses to treat cancer. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 106(8), 310–314. <https://doi.org/10.1177/0141076813494196>

Economopoulou, P., Bourhis, J., & Psyrri, A. (2015). Research Progress in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Best Abstracts of ICHNO 2015. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. 323-8. [https://doi.org/10.14694/EdBook\\_AM.2015.35.e323](https://doi.org/10.14694/EdBook_AM.2015.35.e323)

Economopoulou, P., Kotsantis, I., & Psyrri, A. (2017). The promise of immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: combinatorial immunotherapy approaches. *ESMO Open*, 1(6), 1-9. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2016-000122>

Fakih, M., & Vincent, M. (2010). Adverse events associated with anti-EGFR therapies for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Current Oncology*, 17(1), 18-30.

Farah, C. S., Simanovic, B., & Dost, F. (2014). Oral cancer in Australia 1982 – 2008 : a growing need for opportunistic screening and prevention, 59, 349–359. <https://doi.org/10.1111/adj.12198>

Farkona, S., Diamandis, E. P., & Blasutig, I. M. (2016). Cancer immunotherapy: The beginning of the end of cancer? *BMC Medicine*, 14(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0623-5>

Feller, L. L., Khammissa, R. R. A. G., Kramer, B. B., & Lemmer, J. J. (2013). Oral squamous cell carcinoma in relation to field precancerisation : pathobiology. *Cancer Cell International*, 13(31), 1-8. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-31>

Ferris, R. L. (2015). Immunology and immunotherapy of head and neck cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 33(29), 3293–3304. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.1509>

Ferris, R. L., Blumenschein, G., Fayette, J., Guigay, J., Colevas, A. D., Licitra, L., ... Gillison, M. L. (2016). Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine*, 375(19), 1856–1867. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602252>

Foulkes, M. (2013). Oral cancer: risk factors, treatment and nursing care. *Nursing Standard*, 28(8), 49–57. <https://doi.org/10.7748/ns2013.10.28.8.49.e7593>

Graff, J. N., & Chamberlain, E. D. (2015). Sipuleucel-T in the treatment of prostate cancer: an evidence-based review of its place in therapy. *Core Evidence*, 10, 1–10. <https://doi.org/10.2147/CE.S54712>

Greenberg, M. S., Glick, M., Ship, J.A. (2008). *Burket's Oral Medicine*. Hamilton, BC Decker Ink.

Guo, C., Manjili, M. H., Subjeck, J. R., Sarkar, D., Fisher, P. B., & Wang, X. Y. (2013). Therapeutic cancer vaccines. Past, present, and future. *Advances in Cancer Research*, 119(7), 421-75. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407190-2.00007-1>

Hartmann, S., & Grandis, J. R. (2016). Expert Opinion on Pharmacotherapy Treatment of head and neck cancer in the elderly. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 17(14), 1903–1921. <https://doi.org/10.1080/14656566.2016.1220540>

Huang, S.H., & O'Sullivan, B. (2013). Oral cancer: Current role of radiotherapy and chemotherapy. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 18(2), 233-40. <https://doi.org/10.4317/medoral.18772>

INCA. (2008). Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. *Inca*, (3), 624. <https://doi.org/10.1118/1.4907967>

Ishii, H., Tanaka, S., & Masuyama, K. (2015). Therapeutic strategy for cancer immunotherapy in head and neck cancer. *Advances in Cellular and Molecular Otolaryngology*, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.3402/acmo.v3.27690>

Junior, C. A. L., Alves, F. A., Torres-pereira, C. C., Biazevic, M. G. H., Júnior, D. S. P., & Nunes, F. D. (2013). Câncer de boca baseado em evidências científicas, 67(3), 178–186.

Kaufman, H. L., Kohlhapp, F. J., & Zloza, A. (2015). Oncolytic viruses : a new class of immunotherapy drugs. *Nature Reviews*, 14(9), 642-62. <https://doi.org/10.1038/nrd4663>

Lacouture, M. E., Mitchell, E. P., Piperdi, B., Pillai, M. V., Shearer, H., Iannotti, N., Xu, F., & Yassine, M. (2010). Skin Toxicity Evaluation Protocol With Panitumumab (STEPP), a phase II, open-label, randomized trial evaluating the impact of a pre-emptive skin treatment regimen on skin toxicities and quality of life in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(8), 1351–1357. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.21.7828>

Langendijk, J. A., Jong, M. A., Lemans, R., Bree, R., Smeele, L. E., Doornaert, P., & Slotman, B. J. (2003). Postoperative radiotherapy in squamous cell carcinoma of the oral cavity: the importance of the overall treatment time, 57(3), 693–700. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(03\)00624-2](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(03)00624-2)

Leapman, N. G., Ferris, L. R., & Bauman J. E. (2013). Promising systemic immunotherapies in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Onc*, 49(12), 1089–1096. doi:10.1016/j.oraloncology.2013.09.009.

Matta, A., & Ralhan, R. (2009). Head & Neck Oncology Overview of current and future biologically based targeted therapies in head and neck squamous cell carcinoma, 1(6), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1758-3284-1-6>

Messerschmidt, J. L., Prendergast, G. C., & Messerschmidt, G. L. (2016). How Cancers Escape Immune Destruction and Mechanisms of Action for the New Significantly Active Immune Therapies: Helping Nonimmunologists Decipher Recent Advances. *The Oncologist*, 21(2), 233–243. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0282>

Moskovitz, J. M., & Ferris, R. L. (2018). Tumor Immunology and Immunotherapy for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Dental Research*, 22(6), 680–693. <https://doi.org/10.1177/0022034518759464>

National Cancer Institute (2017). Immunotherapy to Treat Cancer. Retrieved from <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy>

Ohnishi, Y., Minamino, Y., Kakudo, K., & Nozaki, M. (2014). Resistance of oral squamous cell carcinoma cells to cetuximab is associated with EGFR insensitivity and enhanced stem cell-like potency. *Oncology Reports*, 32(2), 780–786. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3258>

Pai, S. I., Zandberg, D. P., & Strome, S. E. (2016). The role of antagonists of the PD-1:PD-L1 / PD-L2 axis in head and neck cancer treatment. *Oral Oncology*, 61, 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.08.001>

Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoint in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.*, 12(4), 252–264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>

Pignon, J., Maillard, E., & Bourhis, J. (2009). Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer ( MACH-NC ): An update on 93 randomised trials and 17 , 346 patients. *Radiotherapy and Oncology*, 92(1), 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2009.04.014>

Psyrrri, A., & Dimairo, D. (2008). Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer, 5(1), 24-31. <https://doi.org/10.1038/ncponc0984>

Rapidis, A. D., & Wolf, G. T. (2009). Immunotherapy of head and neck cancer: Current and future considerations. *Journal of Oncology*, 2009. 1-11. <https://doi.org/10.1155/2009/346345>

Rhodus, N. L., Kerr, A. R., & Patel, K. (2014). Oral Cancer. Leukoplakia, Premalignancy, and Squamous Cell Carcinoma. *Dental Clinics of North America*, 58(2), 315–340. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2013.12.004>

Rivera, C. (2015). Essentials of oral cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 11(9), 11884–11894.

Rosenberg, S. A. (2014). Entering the mainstream of cancer treatment. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 11(11), 630–632. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.174>

Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (2015). Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *National Cancer Institute*. 348(6230), 62-68.

Sadeghi, M., Enferadi, M., & Shirazi, A. (2010). External and internal radiation therapy: Past and future directions, 6(3), 239-248. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.73324>

Sadraei, N. H., Sikora, A. G., & Brizel D. M. (2016) Immunotherapy and Checkpoint Inhibitors in Recurrent and Metastatic Head and Neck Cancer. *Immunotherapy for Head and Neck cancer American Society of Clinical Oncology*, 35, 277–282. [https://doi.org/10.14694/EDBK\\_157801](https://doi.org/10.14694/EDBK_157801)

Schmitz, S., Kian, K., Vermorken, J., Haddad, R., Suarez, C., Wolf, G. T., ... Machiels, J. (2014). Targeted therapies for squamous cell carcinoma of the head and neck : Current knowledge and future directions. *Cancer Treatment Reviews*, 40(3), 390–404. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.09.007>

Schoenfeld, J. D. (2015). Immunity in Head and Neck Cancer. *Cancer Immunology Research*, 3(1), 12–17. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0205>

Schutt, C., Bumm, K., Mirandola, L., Bernardini, G., Cunha, N. D., Tijani, L., ...Chiriva-Internati, M. (2012). Immunological Treatment Options for Locoregionally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *International Reviews of Immunology*, 31, 22–42. <https://doi.org/10.3109/08830185.2011.637253>

Silveira, A., Sequeira, T., Lopes, C., & Monteiro, E. (2012). Oncologia de Cabeça e Pescoço : enquadramento epidemiológico e clínico na avaliação da Qualidade de Vida Relacionada com a Saúde Head and Neck Cancer : Health Related Quality of Life Assessment epidemiological perspectives, 15(1), 38–48.

Skeate, J. G., Woodham, A. W., Einstein, M. H., Da Silva, D. M., & Kast, W. M. (2016). Current therapeutic vaccination and immunotherapy strategies for HPV-related diseases. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 12(6), 1418–1429. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1136039>

Stanculeanu, D. L., Zob, D., Lazescu A., Bunghez, R., & Anghel, R. (2016). Development of new immunotherapy treatments in different cancer types. *Journal of Medicine and Life*, 9(3), 240–248.

Tsantoulis, P. K., Kastrinakis, N. G., Tourvas, A. D., Laskaris, G., & Gorgoulis, V. G. (2007). Advances in the biology of oral cancer, 43, 523–534. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2006.11.010>

Turksma, A. W., Braakhuis, B. J., Bloemena, E., Meijer, C. J., Leemans, C. R., & Hooijberg, E. (2013). Immunotherapy for head and neck cancer patients: Shifting the balance. *Immunotherapy*, 5(1), 49–61. <https://doi.org/10.2217/imt.12.135>

Wen, Y., & Grandis, J. R. (2015). Emerging drugs for head and neck cancer. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 20(2), 313–329. <https://doi.org/10.1517/14728214.2015.1031653>

Whiteside, T. L. (2005). Immunobiology of head and neck cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 24(1), 95–105. <https://doi.org/10.1007/s10555-005-5050-6>

Wong, H. M. (2014). Oral Complications and Management Strategies for Patients Undergoing Cancer Therapy, 2014. Xie, X., O'Neill, W., & Pan, Q. (2017). Immunotherapy for head and neck cancer: the future of treatment? *Expert Opinion on Biological Therapy*, 17(6), 701–708. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1315100>

Xie, X., O'Neill, W., & Pan, Q. (2017). Immunotherapy for head and neck cancer: the future of treatment? *Expert Opinion on Biological Therapy*, 17(6), 701–708. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1315100>