



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

IMUNOTERAPIA NO CANCRO DA MAMA

Trabalho submetido por
Cátia Sofia Laurência Caetano
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Outubro de 2018



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

IMUNOTERAPIA NO CANCRO DA MAMA

Trabalho submetido por
Cátia Sofia Laurência Caetano
para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Maria Guilhermina Martins Moutinho

Outubro de 2018

Agradecimentos

Após o esforço de 5 anos, foram muitas as pessoas que me acompanharam neste longo percurso e que me ajudaram a concretiza-lo.

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais que me proporcionaram esta incrível experiência que foi estudar na Egas Moniz, sem os meus pais nada disto era possível. Um grande obrigado.

Agradeço todo o apoio prestado pela minha orientadora, Professora Doutora Maria Guilhermina Martins Moutinho, pelos sábios conselhos que me ajudaram a conceber este trabalho.

Aos meus avós, irmãos, sobrinhas, namorado e amigos que foram fundamentais ao longo desta caminhada e que me apoiaram em todos os momentos.

Por fim quero agradecer as minhas cinco companheiras de curso, Carolina, Estela, Maria Carlota, Maria Sofia e a Sara, espero que a nossa amizade perdure por muito anos mesmo com a distância que nos separa.

Muito obrigado!

Resumo

O cancro da mama é o cancro mais comum no sexo feminino a nível mundial, havendo cerca de 1,7 milhões de novos casos todos os anos. O cancro da mama é uma neoplasia epitelial maligna, apresentando um potencial de metastização. A neoplasia da mama é caracterizada pela sua heterogeneidade apresentando vários tipos de cancro da mama.

O tratamento padrão consiste na cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapia hormonal, mas estas terapêuticas não são específicas provocando efeitos adversos graves e recaídas. Devido às limitações dos tratamentos tradicionais levou a pesquisa de novas estratégias de tratamento com maior especificidade.

O sistema imunitário desempenha um papel fundamental no organismo, mantendo a homeostase, conferindo a capacidade de proteção contra agentes patogénicos. Posto isto, o sistema imunitário tem a competência no reconhecimento e controlo do crescimento tumoral. No entanto, o sistema imunitário tem uma dupla fase, podendo favorecer o crescimento tumoral inibindo o ambiente antitumoral. A este processo chama-se *immunoediting*.

A imunoterapia tem a capacidade de estimular o sistema imunitário, de forma a destruir o tumor e impossibilitar recorrências. As células efetoras chave na imunoterapia são os linfócitos T citotóxicos, capazes de reconhecer e eliminar as células neoplásicas. Deste modo, a imunoterapia surgiu como uma terapêutica poderosa com elevada especificidade. Na imunoterapia existem diferentes abordagens como; os inibidores do checkpoint, vacinas e transferência de células adotivas. Na atualidade, já é utilizado concomitantemente a imunoterapia com a quimioterapia e várias combinações de imunoterapias.

Apesar dos conhecimentos adquiridos neste momento, existe ainda um longo caminho a percorrer. Existem várias moléculas em desenvolvimento e a associação das diversas terapêuticas vai ser o futuro tratamento no cancro da mama.

Palavra-chave: Cancro da mama, Sistema imunitário, Imunoterapia

Abstract

Breast cancer is the most common cancer among women globally, with around 1.7 million new cases every year. Breast cancer is a malignant epithelial neoplasm, presenting potential metastasis. The breast neoplasm is characterized by its heterogeneity presenting several types of breast cancer.

The standard treatment consists of surgery, radiation therapy, chemotherapy and hormone therapy, but these therapies are not specific, causing serious adverse effects and relapses. Due to the limitations of traditional treatments, this led to the research of new treatment strategies with greater specificity.

The immune system plays a key role in the body, maintaining homeostasis, conferring the ability to protect against pathogens. That said, the immune system has the competence to recognize and control tumor growth. However, the immune system has a double phase, which may favor tumor growth by inhibiting the antitumor environment. This process is called immunoediting.

Immunotherapy has the ability to stimulate the immune system, in order to destroy the tumor and prevent recurrences. Key effector cells in immunotherapy are cytotoxic T lymphocytes, capable of recognizing and killing neoplastic cells. In this way, immunotherapy emerged as a powerful therapy with high specificity. In immunotherapy there are different approaches such as; the checkpoint inhibitors, vaccines and by transferring adoptive cells. Currently using immunotherapy with chemotherapy and various combinations of immunotherapies.

Despite the knowledge acquired at the moment, there is still a long way to go. There are several molecules in development and the combination of the various therapies will be the future treatment in breast cancer.

Keyword: Breast Cancer, Immune System, Immunotherapy

Índice Geral

Índice de figuras	7
Índice de tabelas	8
Lista de abreviaturas	9
Capítulo I- Introdução	13
Capítulo II- Cancro da mama	15
2.2- Cancro da mama em Portugal	17
2.3- Carcinogénese mamária	19
2.3.1-Iniciação tumoral	19
2.3.2-Promoção do tumor	20
2.3.3-Angiogénese	20
2.3.4- Metastização	21
2.3- Fatores de risco.....	24
2.4- Sinais e Sintomas.....	25
2.5- Terapêutica atual	26
Capítulo III- Sistema imunitário.....	29
3.1- Aspectos gerais.....	29
3.2- O papel do sistema imunitário sobre os tumores.....	30
3.2.1- Immunoediting.....	30
3.2.2- Evasão ao sistema imunitário	31
3.3- Antígenos tumorais	31
Capítulo IV- Imunoterapia.....	33
4.1- Imunoterapia no Cancro da mama.....	33
4.2- Tipos de imunoterapia	33
4.2.1-Bloqueio do checkpoint	33
4.2.1.1- CTLA-4.....	33

4.2.1.2- PD-1	34
4.2.1.3- Outros pontos de verificação imunológica	36
4.2.2- Vacina antitumorais	37
4.2.2.1- Vacinas de péptidos	37
4.2.2.2- Vacinas de DNA	39
4.2.2.3- Vacinas de Células Dendríticas (DC)	40
4.2.3- Bloqueio das células T reguladoras	42
4.2.4- Terapia por transferência de células T adotivas	43
4.2.5- Imunoterapia adotiva	45
Capítulo V- Imunoterapia e Quimioterapia	47
Capítulo VI- Conclusão	47
Capítulo VII- Bibliografia	51

Índice de figuras

Figura 1: Evolução do número de mulheres convidadas e rastreadas.....	16
Figura 2: Células tumorais circulantes na corrente sanguínea	20
Figura 3: Cascata de metastização no cancro da mama	22
Figura 4: Fatores de risco no cancro da mama.....	23
Figura 5: Apresentação de antigénios	32
Figura 6: Vacinas de péptidos	35
Figura 7: Vacinas DC.....	38
Figura 8: Transferência de células adotivas	40
Figura 9: Terapia por transferência de células T adotivas	41

Índice de tabelas

Tabela 1: Subtipos do cancro da mama15

Tabela 2: Indicadores de mortalidade associados ao cancro da mama no sexo feminino
.....15

Tabela 3: Consumo de medicamentos do SNS segundo o Plano Nacional de Doenças
Oncológicas no meio hospitalar16

Tabela 4: Células e moléculas solúveis do sistema imunitário27

Lista de abreviaturas

AC- Doxorubicina e Ciclosfosfamida

ADN- Ácido Desoxirribonucleico

APC- Células Apresentadoras de Antígenos (do inglês: Antigen Presenting cell)

ATC- Terapia de Transferência de Células Adotivas (do inglês: *Adoptive T cell transfer therapy*)

BRCA 1- Gene Suscetível para o Cancro da Mama (do inglês: *Breast Cancer susceptibility gene*)

CAR- Recetor de Antígeno quimérico (do inglês: *Chimeric Antigen Receptor*)

COX-2 - Ciclooxigenase-2

CD4+- *Cluster of Differentiation 4+*

CD8+- *Cluster of Differentiation 8+*

CK- Citoqueratina

CK5- Citoqueratina 5

CK6- Citoqueratina 6

CK14- Citoqueratina 14

CK17- Citoqueratina 17

CMF- Ciclosfosfamida, Metotrexato e Fluorouracilo

CTL- Linfócitos T Citotóxicos (do inglês: *Cytotoxic T lymphocyte*)

CTLA-4- Linfócito T Citotóxico Associado a Proteína 4 (do inglês: *Cytotoxic T Lymphocyte Associated protein 4*)

CXCL1- Quimiocina 1

CXCL8- Quimiocina 8

DC- Células dendríticas

ECM- Matriz extracelular (do inglês: *Extracellular matrix*)

EMT- Transição do epitélio mesenquimal (do inglês: *Epithelial to Mesenchymal Transition*)

EGFR- Recetor de Crescimento Epidérmico (do inglês: *Epidermal Growth Factor Receptor*)

FDA- Food and Drug Administration

FEC- Fluorouracilo, Epirubicina e Ciclosfosfamida

FR alfa- Recetor alfa folato

HER2- Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2 (do inglês: *Human Epidermal Growth factor Receptor 2*)

hTERT- Recetor da transcriptase reversa da telomerase humana (do inglês: *Human telomerase reverse transcriptase*)

HSP90- Proteína do Choque Térmico 90 (do inglês: *Heat Shock Protein 90*)

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

IL-7 – Interleucina 7

IL-8 – Interleucina 8

IL-12- Interleucina 12

IL-13- Interleucina 13

IL-17 – Interleucina 17

LAG-3- Ativação Linfocitária Gene-3 (do inglês: *Lymphocyte activation gene-3*)

NK- *Natural Killers*

OMS- Organização Mundial de Saúde

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

MDSC- Células Supressoras Derivadas de Mieloides (do inglês: *Myeloid-derived suppressor cells*)

PD-1- Recetor de Morte Celular Programada-1

PD-L1- Ligando-1 do Recetor da Morte Celular Programada (do inglês: *Programmed Death-ligand 1*)

RE- Receptor de Estrogénio

RP- Receptor de Progesterona

ROS- Espécies reativas de Oxigénio (do inglês: *Reactive Oxygen Species*)

RNI- Intermediários Reativos de Nitrogénios (do inglês: *Reactive Nitrogen Intermediate*)

SNS- Sistema Nacional de Saúde

TAM- Macrófagos Associados ao tumor (do inglês: *Tumor-associated Macrophages*)

TCR- T- Recetor de células T (do inglês: *Cell Receptor*)

TDM-1- Transtuzumab-Emtansina

Th- Linfócito T Auxiliar (do inglês: *T Helper Cells*)

TIL- Linfócitos Infiltrantes de Tumor (do inglês: *Tumor-infiltrating Lymphocytes*)

TIM-3- Imunoglobulina de Células T Mucina 3 (do inglês: *T cell immunoglobulin Mucin-3*)

TLR- Recetor *Toll-Like*

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- α (do inglês: *Tumor Necrosis Factor- α*)

TNF- β - Fator de Necrose Tumoral- β (do inglês: *Tumor Necrosis Factor- β*)

Treg- Linfócito T regulador (do inglês: *Regulatory T Cell*)

VEGF- Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (do inglês: *Vascular Endothelial Growth Factor*)

Capítulo I- Introdução

O cancro da mama é o cancro mais comum no sexo feminino a nível mundial, surgindo cerca de 1,7 milhões de novos casos todos os anos, ou seja, representa aproximadamente 25% de todos os cancros existentes em mulheres (Ferlay et al., 2015).

O tratamento padrão consiste na remoção do tumor através de cirurgia seguido é por radioterapia, quimioterapia ou terapia hormonal. Estas terapêuticas não são específicas e provocam efeitos secundários graves, como náuseas, imunossupressão anemia, perda de cabelo, entre muitas outras. Contudo, as respostas ao tratamento são razoáveis na primeira fase da doença, mas muitos doentes apresentam recaídas. Posto isto, devido às limitações que a terapêutica tradicional apresenta levou a pesquisa de novas terapêuticas, mais específicas e com respostas duradouras (Ferlay et al., 2015; Tao, Visvanathan, & Wolff, 2016).

O sistema imunológico exerce um papel fundamental no organismo humano, sendo responsável por manter a homeostase, tem a capacidade de defender o organismo contra agentes patogénicos. O sistema imunitário pode ser dividido em dois subtipos: imunidade inata e imunidade adaptativa (Lakkis, 2015).

O sistema imunitário é essencial no reconhecimento e controlo do crescimento tumoral, mas também pode promover o seu crescimento eliminando o ambiente antitumoral. Esta dupla fase do sistema imunitário, regressão ou promoção tumoral, é denominado como *immunoediting*. O *immunoediting* é constituído por três etapas: eliminação, equilíbrio e fuga (Kim et al., 2007).

A imunoterapia surgiu como uma abordagem terapêutica poderosa devido à sua especificidade e pela sua capacidade de gerar memória imunológica, ou seja, estimula o sistema imunológico para detetar e eliminar as células tumorais. A imunoterapia é um método totalmente diferente comparativamente aos outros tratamentos, pois, está direcionado para ativação do sistema imunológico e não para o tumor em si (McNutt & Couzin-Frankel, 2013).

Este trabalho foi realizado após uma extensa pesquisa bibliográfica, onde utilizei como base a consulta dos seguintes *sites*, PubMed, B-on e ScienceDirect. Ao longo do trabalho vão ser mencionados vários temas como: cancro da mama, sistema imunitário e

a imunoterapia. Menciono ainda, a utilização concomitantemente da quimioterapia com a imunoterapia.

Capítulo II- Cancro da mama

2.1- O que é?

O cancro da mama é a neoplasia maligna mais frequente no sexo feminino havendo uma tendência para aumentar o número de casos a nível mundial. Esta patologia é uma neoplasia epitelial maligna com potencial metastização. No caso de existirem metástases considera-se iminentemente incurável. A neoplasia da mama caracteriza-se pela heterogeneidade a vários níveis como clínico, morfológico e molecular (Birnbbaum et al., 2004; Enjeti et al., 2005).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1968 avaliou o padrão histológico e de acordo com a heterogeneidade morfológica do cancro da mama observada foi possível distinguir vários tipos de cancro. O grau histológico tem a capacidade de avaliar a diferenciação do cancro da mama, preditivo da terapêutica e valor do prognóstico. É utilizado um score, resultante da soma dos valores de três características histológicas. As três características são: pleomorfismo nuclear, número de mitoses e formação de ductos. Com base nestas particularidades o cancro da mama pode ser classificado como sendo: grau 1 (G1) bem diferenciado (score 3-5), grau 2 (G2) corresponde a moderadamente diferenciado (score 6-7) e por fim o grau 3 (G3) que corresponde pouco diferenciado (score 8-9). Posto isto, é possível concluir que o G1 é considerado como bom prognóstico e G3 é um indicador de mau prognóstico. G2 é o tipo histológico mais frequente. (World Health Organization Expert Committee, 2003).

A OMS introduziu como fatores que contribuem para a classificação o grau histológico, fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2), recetores de estrogénios (RE) e recetores de progesterona (RP). (American Cancer Society, 2013)

Relativamente à classificação molecular, esta efetuada com base na tecnologia “microarrays” de ácido desoxirribonucleico (ADN). Deste modo foi possível classificar subtipos biológicos distintos fundamentados nos padrões de expressão genética. Constatou-se que existem cinco subtipos moleculares que são; luminal A, luminal B, enriquecido com HER2, células basais e idêntico a mama normal. Estes subtipos demonstraram semelhanças e desigualdades a nível da expressão génica, proliferação celular, vias de sinalização, composição celular, prognóstico e sensibilidade à terapêutica (American Cancer Society, 2013; Vieira et al., 2008).

O **subtipo luminal A**, fenotipicamente é RE positivo e HER2 negativo, definido pela expressão elevada de genes exibidos pelas células epiteliais luminais como por

exemplo as citoqueratinas. Posto isto, este fenótipo tem um bom prognóstico devido à boa resposta à terapêutica anti estrogénica. Este subtipo é o menos agressivo e tem um crescimento lento comparativamente aos restantes subtipos (Cardoso, 2011; Vieira et al., 2008).

O **subtipo luminal B**, fenotipicamente é RE positivo e HER2 positivo. Este subtipo está correlacionado com o pior prognóstico estando associado à recidiva tumoral. Apresentam semelhanças aos tumores RE negativos como o subtipo HER2 e basal. O subtipo superexpressão de HER2, fenotipicamente RE negativo e HER2 positivo, a sua principal característica é a subexpressão do fator de crescimento epidérmico HER2. O oncogene HER2 é amplificado simultaneamente com a superexpressão da sua proteína. Importantes biomarcadores usados no prognóstico do cancro da mama. Este subtipo apresenta boa resposta a terapêutica que bloqueiam a atividade do HER2, como por exemplo os anticorpos monoclonais nomeadamente o trastuzumab (American Cancer Society, 2013; Vieira et al., 2008).

O **subtipo basal**, fenotipicamente RE negativo e HER2 negativo, é caracterizado pela expressão de diversos genes expressos nas células progenitoras ou basais. Verificou-se que este fenótipo demonstrou positividade para alguns tipos de citoqueratinas (CK) como a CK5, CK6, CK14 e CK17. Também foi possível verificar-se a positividade para o recetor do crescimento epidérmico (EGFR), P-caderina e p63. Estas são proteínas expressas pelas células basais. Tendo em conta todos estes fatores demonstrou-se que está associado a mutações genéticas no gene BRCA1. O gene BRCA1 é um gene supressor de tumor que regula o ciclo celular e previne a proliferação descontrolada. Relativamente ao prognóstico, este é o subtipo com pior prognóstico. Não possui um alvo terapêutico determinado comparativamente aos outros subtipos do cancro da mama, por este motivo não tem uma boa resposta à terapêutica anti estrogénica e aos anticorpos monoclonais anti-HER2 (Sharma et al., 2018; Vieira et al., 2008).

O **subtipo normal Breast-like** existe uma expressão aumentada de alguns genes conhecidos no tecido adiposo e noutros tecidos não epiteliais. Verificou-se que este tipo de tumores demonstram uma elevada expressão para genes epiteliais e baixa expressão para os genes do epitélio luminal. Posto isto, ainda existem algumas lacunas a nível clínico e na sua distinção (American Cancer Society, 2013; Vieira et al., 2008).

Tabela 1: Subtipos do cancro da mama (adaptado de Cardoso, 2011)

Luminal A	Luminal B	HER positivo	Basal (triplo negativo)
Prognóstico favorável	Prognóstico desfavorável	Geralmente G3	Geralmente G3
G1 ou G2	G2 ou G3		
RE e RP altos HER negativo	RE e RP baixos HER negativo	RE e RP negativos ou positivos HER positivo	RE e RP negativo HER negativo

2.2- Cancro da mama em Portugal

Os cancros mais frequentes em Portugal em 2010 foram: o cancro colorretal, cancro da próstata, cancro da mama e do pulmão. O total de casos de cancro em Portugal foi de 51,2%, dos quais cerca de 31,1% foram casos de cancro da mama no sexo feminino. Deste modo, foi possível observar que é um tumor mais frequente no sexo feminino (Oncol, Editado, & Gentil, 2010).

O cancro da mama é uma das principais causas de morte em Portugal, tendo variações na mortalidade verificando-se um aumento pouco acentuado do número de óbitos assim como na mortalidade padronizada no sexo feminino. Os valores de 2015 comprovam este aumento discreto, pois houve acréscimo de 0,3% comparativamente ao ano anterior (Tabela 2). Constatou-se que existe uma diferença geográfica da mortalidade em Portugal, sendo a zona mais afetada é a região dos Açores. (Direcção-Geral da Saúde, 2017)

Tabela 2: Indicadores de mortalidade associados ao cancro da mama no sexo feminino (retirado de DGS, 2017)

TUMOR MALIGNO DA MAMA FEMININA					
	2011	2012	2013	2014	2015
Número de óbitos	1.634	1.752	1.640	1.660	1.683
Taxa de mortalidade padronizada	19,0	20,0	18,2	17,9	18,2

No ano de 2016, houve um aumento significativo no programa de rastreios oncológicos. Havendo assim uma expansão a nível da cobertura geográfica, aumentando o número de rastreios e verificou-se uma evolução na adesão (+5%). De forma a colmatar esta problemática o número de mulheres convidadas e rastreadas tem vindo a aumentar

significativamente abrangido 83% da população nacional. Na região do Norte do país conseguiu-se atingir cobertura geográfica de 100%. Os rastreios para doenças oncológicas permitem alertar a população para este problema de forma a detetar casos precocemente e minimizar a taxa de mortalidade (Andrade & Ferreira, 2016; Direcção-Geral da Saúde, 2017).

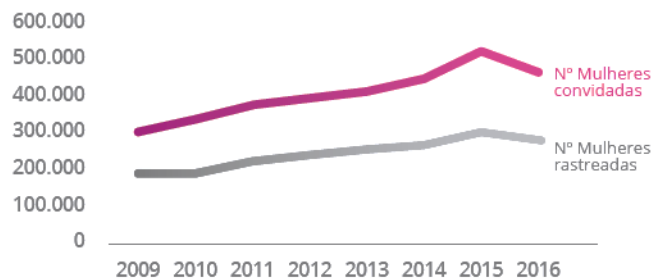


Figura 1: Evolução do número de mulheres convidadas e rastreadas (retirado de DGS, 2017)

O Sistema Nacional de Saúde (SNS) aumentou o consumo de medicamentos oncológicos a nível hospitalar, tendo-se registado um crescimento de 6% no ano de 2016. Este aumento foi mais significativo no grupo dos imunomoduladores principalmente a nível hospitalar. Por sua vez, a despesa para o SNS aumentou cerca de 7% por serem tratamentos dispendiosos (Tabela 3) (Direcção-Geral da Saúde, 2017).

Tabela 3: Consumo de medicamentos do SNS segundo o Plano Nacional de Doenças Oncológicas no meio hospitalar (retirado de DGS, 2017)

CFT Descrição	QUANTIDADE			VALOR		
	2015	2016	Variação	2015	2016	Variação
Citotóxicos	6.744.172	7.071.424	+4,8%	113.483.469	116.689.923	+2,8%
Imunomoduladores	328.000	349.207	+6,4%	98.948.763	111.269.519	+12,4%
Hormonas + antihormonas	23.970.615	25.651.237	+7 %	23.970.615	25.651.237	+7%

2.3- Carcinogénese mamária

2.3.1-Iniciação tumoral

A iniciação tumoral é um mecanismo pelo qual as células normais têm o primeiro impacto mutacional, proporcionando benefícios de crescimento e sobrevivência. Podem ocorrer alterações do DNA continuamente, para que uma célula maligna origine um cancro, os mecanismos de regulação podem falhar ou ser ineficientes. Na grande maioria dos casos uma mutação é insuficiente para existir progressão para um cancro, sendo necessário cerca de quatro a cinco mutações. Estas mutações têm de ser transmitidas ao longo das gerações impreterivelmente. Relativamente ao microambiente inflamatório verificou-se que existe um aumento das taxas de mutação e proliferação das células mutadas (Grivennikov et al., 2010).

Os radicais livres são produzidos pelo organismo por diversos mecanismos, tanto através de processos metabólicos aeróbios como através das células inflamatórias. Os radicais livres têm a competência de inter-relacionar-se com o DNA e causar modificações. As células inflamatórias ativadas sintetizam as Espécies Reativas de Oxigénio (ROS) e Intermediários Reativos de Nitrogénios (RNI), tendo a capacidade de induzir anomalias ao DNA e instabilidade genómica. Contudo, não está claro que ROS e RNI que são produzidas e libertadas pelas células inflamatórias ativas (neutrófilos ou macrófagos). Estas têm um tempo de semi-vida suficiente para atingir e alterar o DNA. Alternativamente, as células inflamatórias podem conceber citocinas como TNF- α . Como há uma acumulação de ROS nas células epiteliais vizinhas, tem sido debatido se os mecanismos imunomediadores têm uma força crítica por detrás da iniciação tumoral (Hussain, Hofseth, & Harris, 2003; Meira, Bugni, & Green, 2008; Grivennikov et al., 2010).

As mutações p53 são causadas pelo *stress* oxidativo, podendo ser encontradas no epitélio inflamado e nas células cancerígenas, comprovando que a inflamação crónica causa mutações no DNA. Aproximadamente 5% dos casos das mulheres portadoras desta mutação desenvolvem cancro da mama e são diagnosticadas antes dos trinta anos de idade (Kraus & Arber, 2009; Apostolou & Fostira, 2013).

O processo inflamatório pode promover as alterações no genoma humano. A mutagénese pode desencadear inutilizar ou reprimir os genes ou enzimas que são encarregadas pela sua restauração, como por exemplo o ROS. Desta forma, pode-se constatar que o papel da inflamação e a iniciação tumoral estão relacionadas, pois a

inflamação pode desencadear a iniciação tumoral mas pode-se constatar também que anomalias do DNA podem suscitar um processo inflamatório e iniciar o desenvolvimento de um tumor (Hussain et al., 2003; Colotta, Allavena, Sica, Garlanda, & Mantovani, 2009; Grivennikov et al., 2011).

2.3.2-Promoção do tumor

No momento em que uma célula maligna é formada, esta começa a transmitir o seu genoma à geração seguinte. A promoção tumor consiste no crescimento do tumor, deste modo passar de uma célula única para um tumor primário desenvolvido. Relativamente, ao crescimento tumoral inicial está dependente da amplificação da proliferação celular e na redução da morte celular. Estes dois processos são estimulados por mecanismos inflamatórios. A promoção tumoral quando é induzida por uma inflamação, esta pode suceder prematuramente ou tardiamente no desenvolvimento tumoral podendo levar à activação de células pré-malignas já existentes há anos. A inflamação vai promover a progressão do tumor (aumentando a proliferação e aumento da sobrevivência) e está relacionado com angiogénese (Grivennikov et al., 2010).

As citocinas são promotores tumorais que activam os fatores de transcrição. O Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), Interleucina 1 β (IL-1 β), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 7 (IL-7) e Interleucina 17 (IL-17) são exemplos de citocinas produzidas pelo nosso organismo. O TNF- α representa um importante papel na carcinogénese, estando também envolvido na propagação tumoral. A IL-1 β tem um papel controverso na promoção tumoral, pois em baixas concentrações instiga um processo inflamatório promovendo as elevadas concentrações de citocinas que promovem a progressão do tumor. Relativamente a IL-6 é possível analisar nos níveis séricos, pois, em pacientes com cancro encontram-se com níveis séricos elevados de IL-6. As IL-7 e IL-17 desempenham uma acção pelas células T auxiliares na promoção tumoral. Em suma, as citocinas tem uma capacidade de incitar inflamação e promover o recrutamento celular (Gaiotti et al., 2000; Chung & Chang, 2003; Kai et al., 2005; Bonecchi et al., 2009).

2.3.3-Angiogénese

A angiogénese consiste no aumento sanguíneo intratumoral, ou seja, aumenta a capacidade de crescimento e metastização. Baseia-se no surgimento de novos capilares que estão ligados aos vasos existentes, resultando de um equilíbrio complexo entre fatores

pró-angiogénico e antiangiogénese. Este equilíbrio é imprescindível para o crescimento dos tumores primários e na metastização. O processo de angiogénese ocorre devido a carências nutricionais, nomeadamente pela falta de oxigénio. Assim sendo, quando existe uma carência de oxigénio nas células tumorais, estas podem entrar em hipoxia. A hipoxia vai desencadear um processo inflamatório conduzindo ao recrutamento das células imunitárias estendendo à formação dos novos vasos. Posto isto, derivado ao estado de hipoxia os TAMs são recrutados tendo uma função importante na angiogénese. Os TAMs irão produzir quimiocinas e fatores de angiogénese, como por exemplo a interleucina 8 (IL-8), quimiocina L1 (CXCL1), quimiocina L8 (CXCL8) e Factor de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF). As quimiocinas vão ter uma acção proliferativa das células (Grivennikov et al., 2010; Trédan et al., 2015; van Uden et al., 2015).

2.3.4- Metastização

No ano de 1980, o investigador Stephen Paget criou a teoria da semente e solo para o processo da metastização, sendo que a semente corresponde às células tumorais e o solo ao ambiente apropriado para o processo. Esta teoria tem vindo a ser desenvolvida. O microambiente tumoral é um ponto crítico no desenvolvimento da metástase. As células malignas estão constantemente a interagir com as células do microambiente circundante, esta interação proporciona a progressão do cancro da mama para um cancro da mama metastático. O cancro da mama metastático é responsável pelo maior número de mortes (Weigelt et al., 2005; Scully et al., 2012; Murray & Conghlin, 2014).

A cascata metastática é composta por uma série de etapas sequenciais, quando uma das etapas não é cumprida o processo da metastização é interrompido. A metastização inicia-se com a invasão, posteriormente ocorre a migração e mobilidade. Ocorre a invasão local do tecido hospedeiro circundante por células tumorais e persiste até atingir os vasos sanguíneos ou vasos linfáticos (Figura 2) (Ha, Faraji, & Hunter, 2013; Scully et al., 2012; Sergey V. Kozin, Walid S. Kamoun, Yuhui Huang, Michelle R. Dawson, Rakesh K. Jain, 2010).

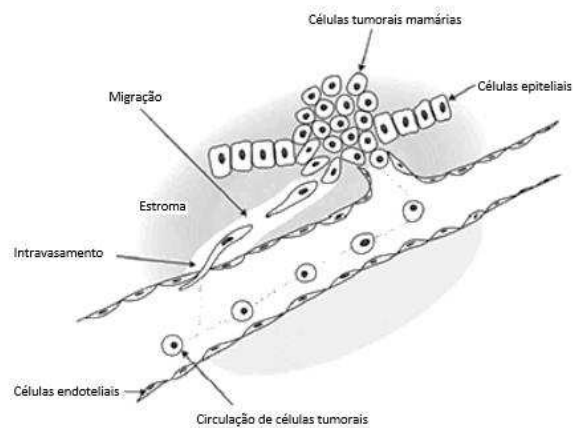


Figura 2: Células tumorais circulantes na corrente sanguínea (adaptado de Scully et al., 2012)

A etapa da invasão inicia com o ataque das células tumorais no tecido hospedeiro circundante. Posto isto, as células tumorais que invadem o tecido circundante iram provocar uma alteração na adesão célula-célula primeiramente e em seguida adesão celular à matriz extracelular (ECM). A família das caderinas têm um importante papel na adesão célula-célula (Li & Feng, 2011).

A caderina-E vai actuar a nível da adesão célula-célula. Para que uma célula tumoral consiga desagregar das restantes é indispensável que aconteçam alterações na expressão da caderina-E. A caderina-N está associada as células mesenquimais, estando assim relacionada com a transição epitélio mesenquimal (EMT). Existe evidência científica como o EMT está associado à progressão do cancro, permitindo a invasão e o intravasamento na corrente sanguínea. Verificou-se que o aumento da caderina-N proporciona aderência das células tumorais às células estromais, esta ligação à ECM provoca uma resposta mediada por intreginas, como por exemplo fibronectina, colagénio e fibrinogénio. As células estromais que ajudam no processo de migração das células tumorais, no caso do cancro da mama, são os fibroblastos. Posto isto, constactou-se que a invasão provoca uma degradação do ECM para possibilitar a penetração das células tumorais nos tecidos circundantes (Guarino et al., 2007; Bonnomet et al., 2010; Mego et al., 2010; Wendt et al., 2011).

A segunda etapa consiste na migração e mobilidade. Com o intuito de conseguir um fenótipo mais invasivo, as células tumorais têm a necessidade de migrar do local primário para outros locais do organismo. Estas podem migrar isoladamente ou agrupadas. A migração agrupada pode ser alterada para isolada, devido às anomalias estruturais ou anomalias funcionais das proteínas responsáveis pela adesão intercelular. As células tumorais que migram de forma coletiva necessitam da presença destas forças intercelulares. Após este processo de invasão circulam na corrente sanguínea ou nos vasos linfáticos, semelhante a um êmbolo (Scully et al., 2012).

Relativamente às células tumorais que migram isoladamente, existem duas formas de migração, por movimento mesenquimal que depende de proteases ou por movimento amebóide independente de proteases. A respeito da migração através mesenquima, a EMT é um rumo crítico para migração de uma célula tumoral, por isso existirá uma mudança no fenótipo de epitelial para mesenquimal. O EMT desintrega a adesão célula-célula, perdendo a caderina-E e expressando marcadores mesenquimais. A vimetina é um exemplo de marcador mesenquimal. Após esta perde de adesão, ocorre uma alteração na polaridade. Desta forma inicia a migração celular desencadeado pelas alterações nas fibras de actina. Estas modificações nas fibras de actina vão provocar modificações no citoesqueleto fazendo com que as enzimas proteolíticas sejam activadas e alterem adesão à matriz celular. As células submetidas à EMT sofrem um alongamento, adquirindo uma forma de fibroblasto de modo a facilitar o seu movimento (Blick et al., 2008; Friedl & Wolf, 2008; McSherry et al., 2007; Scully et al., 2012).

Por outro lado, as células que se deslocam por movimento amebóide são células arredondadas semelhantes aos organismos unicelulares primitivos. Estes vão se movimentar através dos poros da matriz, por deformação da forma e por mudanças na estrutura do ECM. Estas células são fracamente ligadas ao ECM perdendo a polaridade e movimentando-se por caminhos de menor resistência (Provenzano et al., 2008; Yilmaz & Christofori, 2010).

Em suma, as células tumorais recorrem maioritariamente à motibilidade mesenquimal. Contudo, em certas ocasiões podem alterar o modo de migração seja do movimento mesenquimal para amebóide como vice-versa (Paňková et al., 2010).

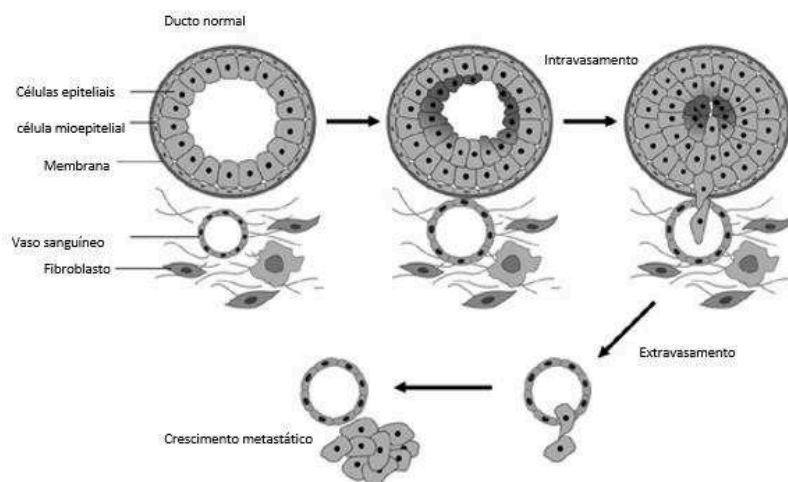


Figura 3: Cascata de metastização no cancro da mama (adaptado de Scully et al., 2012)

2.3- Fatores de risco

No cancro da mama os principais fatores de risco são idade, historia familiar, fatores reprodutivos, estrogénio e o estilo de vida (Figura 4). Além do sexo, a idade é um fator muito importante no risco de desenvolver cancro da mama. É imprescindível a realização de mamografias a partir dos 40 anos, visto que a maioria dos casos se encontram entre os 40-60 anos (Sun et al., 2017).

A história familiar está associada a um grande número de casos de cancro, ou seja, as mulheres que têm uma mãe ou irmã com cancro da mama estão suscetíveis a doença. Para além da história familiar, é necessário avaliar os genes suscetíveis, como o BRCA1 e BRCA2 (Brewer, Jones, Schoemaker, Ashworth, & Swerdlow, 2017).

Os fatores reprodutivos estão associados à menarca precoce, menopausa tardia e a idade da primeira gravidez. Por cada ano de atraso da menopausa o risco de cancro da mama aumenta cerca de 3%. Em oposição, por cada ano de atraso da menarca ou em cada parto adicional irá haver uma diminuição de 5 ou 10% no risco de contrair a doença, respetivamente (Dall & Britt, 2017).

Os estrogénios endógenos e exógenos estão associados ao risco de cancro da mama. O estrogénio endógeno é produzido nos ovários, sendo que a ovariectomia reduz o risco desta patologia. As principais fontes de estrogénio exógenos são os contraceptivos orais e a terapia de reposição hormonal. Desde 1960 que os contraceptivos orais são

utilizados e comprovou-se que não aumentam o risco de cancro da mama. Em contraposição, a terapia de reposição hormonal que consiste na administração de estrogénios exógenos e outras hormonas em mulheres na menopausa ou pós-menopausa. O uso desta terapêutica aumenta o risco de cancro da mama (Campbell et al., 2007; Soroush et al., 2016).

O estilo de vida tem alterado ao longo dos anos, houve um aumento do consumo de gordura que contribui-o para o aumento do risco. Além disso, o consumo de álcool excessivo provoca um aumento do nível de hormonas, nomeadamente do estrogénio. A ingestão de 35-44 gramas de álcool por dia eleva o risco de cancro da mama cerca de 32%. Relativamente ao tabaco, existe muita controvérsia, mas foi detetado no fluido mamário de mulheres não lactantes resíduos mutagénicos provenientes do fumo do tabaco. Constatou-se que fumar, especialmente em idade precoce, tem um risco associado há ocorrência de cancro da mama (Makarem, Chandran, Bandera, & Parekh, 2013; Catsburg, Miller, & Rohan, 2015; Jung et al., 2016).

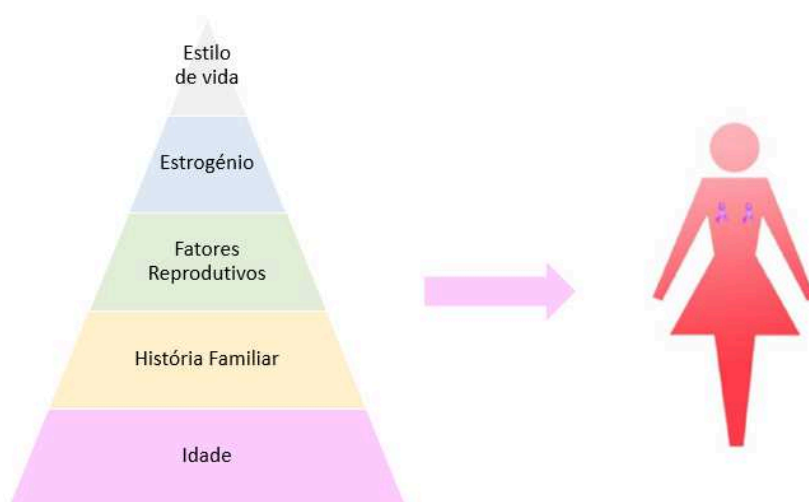


Figura 4: Fatores de risco no cancro da mama (adaptado de Sun et al., 2017)

2.4- Sinais e Sintomas

O cancro da mama num estado inicial da doença pode ser assintomático, mas em alguns casos podem ser visíveis nódulos cutâneos. É imprescindível avaliar se existem nódulos perto da mama ou na axila e/ou clavícula, mudança no tamanho ou forma da mama, aumento da sensibilidade no mamilo, retração mamilar recente, ulceração, eczema mamilar, mamilo ou aréola com aspeto de “escamas”. Além disto, podem surgir sinais como secreção de líquido pelo mamilo. Estas secreções podem apresentar características sanguinolenta, unicanalicular e espontânea (DGS, 2007).

2.5- Terapêutica atual

A terapêutica para o cancro da mama tem vindo a evoluir substancialmente e cada vez mais as técnicas abordadas são menos invasivas. A finalidade do tratamento no cancro da mama é erradicar o tumor, controlar localmente o tumor e prevenir a formação de metástases. As técnicas mais utilizadas são: a cirurgia, radioterapia, quimioterapia e hormonoterapia (Rovera et al., 2013).

A cirurgia é um método de tratamento definitivo e existem dois procedimentos cirúrgicos possíveis, cirurgia conservadora e a mastectomia. A cirurgia conservadora consiste na remoção do tumor e de uma porção de tecido saudável na zona circundante do mesmo. É utilizada em doentes que exibam condições para efetuar radioterapia, isto se o volume de tumor em relação ao volume da mama permitir. A mastectomia é uma técnica mais agressiva, onde é removido a glândula mamária, mamilo, auréola e podendo atingir os gânglios linfáticos. Recorre-se à técnica da mastectomia quando não é possível realizar radioterapia, este procedimento é utilizado quando as lesões se encontram distantes sendo impossível serem retirados em bloco (Rebelo et al., 2007).

A radioterapia é uma terapêutica adjuvante quando o doente é submetido a uma cirurgia do tipo conservadora. Esta técnica deve ser realizada pós-operatório, reduzindo aproximadamente 50% o risco de uma recorrência. A radioterapia vai provocar uma resposta inflamatória elevada derivado da libertação dos mediadores inflamatórios e à necrose celular (White, 2013).

A quimioterapia a utilizar depende do estado da doença após análise dos exames médicos realizados e da idade do doente. Existem variados ciclos de quimioterapia, sendo os mais utilizados; fluorouracilo, epirrubicina e ciclofosfamida (FEC) ou ciclofosfamida, metotrexato e fluorouracilo (CMF) ou por fim doxorrubicina e ciclofosfamida (AC). O CMF e AC são considerados muito semelhantes por apresentarem resultados equivalentes (Berruti et al., 2005; Rebelo et al., 2007).

A hormonoterapia requer uma avaliação imunohistoquímica dos recetores de estrogénio e progesterona, tendo como base a percentagem de células neoplásicas que deve ser superior a 10% para iniciar a terapêutica hormonal. O tamoxifeno é a primeira escolha para uma doente pré-menopausa, devido à sua capacidade antiestrogénica não esteróide. Deste modo vai concorrer com o estradiol na ligação aos recetores de adenocarcinomas humano. Os inibidores da aromatase, como por exemplo anastrozol, vai

inibir a formação de estrogénios e por sua vez vai reduzir o crescimento de cancros RE positivos. Posto isto, estes são utilizados como primeira linha em mulher com pós-menopausa (Ribeiro, 2014).

A inflamação tem um papel muito importante no crescimento tumoral. Posto isto, são utilizadas várias moléculas anti-inflamatórias em conjunto com os tratamentos tradicionais. Os inibidores da Ciclooxygenase-2 (COX-2) têm a capacidade anti-proliferativa, anti-metastática, inibidor da angiogénese e supressor do sistema imunitário. Estudos demonstraram que a utilização do celecoxib é benéfica como terapia adjuvante no caso do cancro da mama com a mutação p53, pois, induz apoptose e a sua capacidade anti-angiogénica (Yoshinaka et al., 2006).

Relativamente às prostaglandinas são capazes de aumentar a expressão do gene da aromatase. Esta estimulação vai provocar um aumento na biossíntese de estrogénio. O estrogénio é um importante fator na carcinogénese do cancro da mama (Farag, 2015).

Capítulo III- Sistema imunitário

3.1- Aspectos gerais

O sistema imunitário tem como função manter a homeostase, é um sistema complexo que requer várias células que estão distribuídas por diferentes locais do corpo. As células imunológicas movimentam-se pela corrente sanguínea e vasos linfáticos. As células do sistema imunitário encontram-se em dois locais: nos órgãos linfóides primários (medula óssea e timo) e nos órgãos linfóides secundários (baço, intestino e nódulo linfáticos) (Parkin & Cohen, 2001; Calder, 2013).

O sistema imunitário está subdividido em imunidade inata e adaptativa. A imunidade inata age em conjunto com a imunidade adaptativa, deste modo permite uma ação rápida sendo autónomo do estímulo preexistente. Existem vários procedimentos de defesa do sistema imunitários como barreiras físicas, químicas, biológicas, constituintes celulares e moléculas solúveis (Eduardo Coelho Andrade Rua Botucatu et al., 2010).

A imunidade inata tem uma resposta veloz, tendo como células efetoras os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e as células NK. Tem a capacidade de fagocitose e libertação de mediadores inflamatórios como as citocinas e quimiocinas. A imunidade adaptativa vai necessitar da ativação de células especializadas, como os linfócitos e moléculas solúveis que são produzidas. A resposta adquirida tem várias características como a sua especificidade e variedade de reconhecimento, memória, resposta específica, autolimitações e tolerância a certos constituintes do organismo. As células apresentadoras de antígenos têm um papel importante na ativação da imunidade adquirida, pois, irão apresentar os antígenos ao MHC (Elves et al. 2000; Varga, 2000).

As células dendríticas interligam a imunidade inata com adaptativa, pois, estas capturam e apresentam os antígenos aos linfócitos. Posto isto, são chamadas e ativadas pelo sistema imunitário inato e são chamados os linfócitos T pela resposta adaptativa (Banchereau et al., 2000).

Tabela 4: Células e moléculas solúveis do sistema imunitário (retirado de Eduardo Coelho Andrade Rua Botucatu et al., 2010)

Componente	Imunidade inata	Imunidade adquirida
Células	Fagócitos (células dendríticas, macrófagos e neutrófilos) Células <i>natural-killer</i> (NK) Mastócitos, basófilos e eosinófilos	Linfócitos T, B e NK/T Células dendríticas ou apresentadoras de antígenos (APCs)
Moléculas solúveis	Complemento Proteínas de fase aguda Citocinas Quimiocinas	Anticorpos Citocinas Quimiocinas

3.2- O papel do sistema imunitário sobre os tumores

3.2.1- Immunoediting

O papel do sistema imunológico no reconhecimento e no controlo do crescimento do tumor é bem sustentado, mas o sistema imunitário também pode promover a progressão do tumor suprimindo o ambiente antitumoral. O duplo papel do sistema imunitário, na supressão ou promoção tumoral, é chamado de *immunoediting*. Este é composto por três fases: eliminação, equilíbrio e fuga (Teng, Galon, Fridman, & Smyth, 2015).

A fase de eliminação consiste na eliminação das células mutadas. No entanto, as células malignas têm a capacidade de adquirir características que lhes conferem resistência a esta fase. Deste modo, as células resistentes à fase de eliminação irão originar novas descendências (Mittal, Gubin, Schreiber, & Smyth, 2014; Teng et al., 2015).

Após a etapa de eliminação é estabelecido um equilíbrio, não existe regressão nem promoção tumoral. A fase de equilíbrio é semelhante a uma dormência, porque as células cancerígenas batalham pela sua sobrevivência e o sistema imunitário luta para eliminar as células malignas. Depois do decorrer deste processo as células são menos imunogénicas, ou seja, após as pressões executadas pelas células imunitárias é feita uma seleção das células cancerígenas. As células cancerígenas sobreviventes exibem um maior número de alterações no genoma (Koebel et al., 2007; Mittal et al., 2014).

A fase de escape acontece quando as células cancerígenas possuem características que lhes conferem a capacidade de não serem detetadas pelas células do sistema imunitário. Deste modo, o crescimento das células malignas deixa de estar comprometida conferindo a capacidade de crescimento e tardiamente de invasão dos tecidos circundantes e posteriormente metastização (Wu et al., 2013; Mittal et al., 2014).

3.2.2- Evasão ao sistema imunitário

Os tumores têm a capacidade de desenvolver mecanismos de resistência à resposta imunitária, de forma a escapar às células imunológicas. As células tumorais têm uma elevada taxa de proliferação dificultando o controlo efetivo do sistema imune, deste modo, algumas das células tumorais conseguem escapar aos mecanismos de defesa do organismo. Um dos principais métodos de fuga das células neoplásicas é através da diminuição de moléculas de MHC I, para ativar os linfócitos T CD8+ é necessário a interação entre TCR e MHC I (Harmey et al., 2002; Steeg, 2006).

A baixa expressão de MHC I proporciona vantagens às células-alvo, ou seja, a diminuição da apresentação de antígenos na superfície confere uma maior segurança das células tumorais. Diminuindo as hipóteses de reconhecimentos dos antígenos tumorais pelos linfócitos T CD8+. Quando existem alterações na expressão de moléculas MHC II está associado à infiltração de linfócitos T CD4+ na região tumoral (Maccalli, Scaramuzza, & Parmiani, 2009).

A expressão de certas proteínas envolvidas em diferentes fases do processamento de antígenos nos proteossomas, como a LMP2 e LMP7, encontra-se diminuída no cancro da mama. Apresentação dos antígenos tumorais fica comprometida, deste modo vai limitar a resposta imune específica antitumoral (Smyth, Godfrey, & Trapani, 2001; Kryczek et al., 2009).

O controlo da resposta imunitário é essencial na prevenção de doenças autoimunes. O sistema imunitário tem células responsáveis pela regulação do sistema imunitário, tendo uma ação supressora da resposta e com a finalidade de evitar a destruição do sistema. As células T regulatórias, num dado momento como linfócitos T CD4+/CD25+, tem aptidão de suprimir a ativação e proliferação das células CD4+ e CD8+ devido à produção da interleucina 13 (IL-13). A IL-13 é um potente inibidor da resposta imunitária (Yu & Fu, 2006).

As células imunológicas podem exercer tanto um papel de regulação da resposta imune como pode ser repressor da imunidade antitumoral, facilitando o crescimento do tumor (Gallimore & Simon, 2008).

3.3- Antígenos tumorais

Os antígenos tumorais estão presentes no tumor mas também no sangue e noutros líquidos biológicos. Estes são fatores fundamentais para diferenciar células normais das

células tumorais. No cancro da mama os principais antigénios tumorais são os recetores HER2 e hormonais (RE e RP) (Ricardo, Almeida, Pedrosa, Leite, & Ribeiro, 2007).

Relativamente ao recetor HER2, é o recetor responsável pelo crescimento epidérmico humano do tipo 2. Esta proteína, em condições fisiológicas normais, é responsável pelo crescimento das células epiteliais. O gene codificante desta proteína é o gene ERBB2, posicionado no cromossoma 17, quando ocorre uma mutação neste gene pode desencadear um cancro porque não ocorre a regulação celular. A proteína HER2 localiza-se livre na membrana celular e quando esta se liga ao recetor vai provocar uma auto-fosforilação da tirosina quinase. Deste modo, são enviados sinais que regulam o crescimento celular. Quando existe uma sobre-expressão deste fator na superfície da membrana celular, existe uma grande quantidade de moléculas de fator de crescimento ligando-se às células provocando um crescimento descontrolado. Havendo um aumento significativo da velocidade de divisão favorecendo a progressão do tumor. O cancro da mama HER2+ é mais agressivo comparativamente aos outros (Apolinário, 2012).

Os recetores RE localizam-se na superfície da membrana nuclear, são recetores dependentes do estrogénio. Existem dois tipos de RE, α e β . O estrogénio é fundamental para o crescimento e desenvolvimento das glândulas mamárias e o recetor mais encontrado nesse local é o β . A hormona penetra na célula por difusão passiva através da membrana plasmática, posteriormente vai interagir com o recetor que se encontra na superfície da membrana nuclear formando-se um complexo alterando a conformação do recetor. Este complexo entra no núcleo, onde tem a capacidade de agir como co-fator de enzima responsável pela transcrição genética. O tratamento para os casos com RE positivo passa pela inativação destes recetores de forma a inibir a transcrição genética (Haldosén, Zhao, & Dahlman-Wright, 2014).

Os recetores de RP são muito semelhantes aos recetores de RE. Formando o complexo progesterona-recetor responsável pela transcrição genética. Deste modo, os antagonistas da progesterona são essenciais para subtipos com RP positivo (Yip & Rhodes, 2014).

Capítulo IV- Imunoterapia

4.1- Imunoterapia no Cancro da mama

O cancro da mama é o cancro mais comum em mulheres em todo o mundo. As terapêuticas tradicionais não são específicas e causam efeitos secundários graves, tais como; náuseas, vômitos, perda de apetite, fadiga, perda de cabelo e deficiência cognitiva. Apesar das respostas serem positivas ao tratamento tradicional nos primeiros estadios da doença, muitos doentes têm recidivas. Devido a estas limitações os investigadores pesquisaram novas alternativas terapêuticas (Moreno Ayala, Gottardo, Asad, et al., 2017).

A imunoterapia tem como objetivo ativar o sistema imunitário de forma a destruir o tumor e impedir a sua recorrência. As células efetoras chave neste processo são os linfócitos T citotóxicos (CTL), são células preparadas para reconhecer e matar as células tumorais. Nos últimos anos, houve um avanço significativo na imunoterapia devido ao desenvolvimento de vacinas, bloqueio do *checkpoint*, bloqueio de células T reguladoras, terapia por transferência de células T adotivas e imunoterapia adotiva (Vigneron, 2015).

4.2- Tipos de imunoterapia

4.2.1-Bloqueio do *checkpoint*

4.2.1.1- CTLA-4

O CTLA-4 é um coreceptor inibitório presente na superfície das células T capaz de inibir a sua proliferação e ativação. Este coreceptor vai competir com CD28, para a ligação com CD80 e CD86, estas são responsáveis pela ativação das células T que estão presentes nas células apresentadoras de antígeno (APC). CTLA-4 tem uma maior afinidade com CD80 e CD86 do que para o CD28 (Moreno Ayala, Gottardo, Asad, et al., 2017).

A elevada expressão de CTLA-4 está associada a um mau prognóstico. CTLA-4 é um alvo terapêutico aliciante, pois tem a capacidade de melhorar a imunidade antitumoral em pacientes com cancro da mama. A Food and Drug Administration (FDA) aprovou o ipilimumab como o primeiro anticorpo monoclonal humanizado contra CTLA-4. A segurança e eficácia do bloqueio do CTLA-4 em doentes com cancro da mama

continua a ser estudada. nomeadamente em associação a outros bloqueios imunológicos adicionais ou com citotóxicos (Yu et al., 2015; Moreno Ayala et al., 2017).

Relativamente à resposta clínica, o bloqueio do *checkpoint* pode exibir respostas únicas comparativamente à terapêutica tradicional. A eficácia terapêutica pode ser observada logo na fase inicial na progressão do tumor. Apesar desta terapêutica ser inovadora no cancro da mama apresenta uma desvantagem preocupante, a toxicidade imunológica. O CTLA-4 vai limitar ativação das células T e a progressão tumoral, este bloqueio vai provocar uma redução significativa das células T ficando abaixo do limiar necessário. Consequentemente, irá provocar danos colaterais na imunidade como por exemplo; colite, dermatite, uveíte e hipofisite (Bertrand et al., 2015; Shimomura et al., 2016).

No caso de ocorrer um efeito colateral, o tratamento é suspenso imediatamente e o doente deve ser tratado com corticosteróides. Consequentemente, este imunossupressor vai neutralizar o efeito antitumoral da imunoterapia. De forma a colmatar este problema foi investigado o uso por via subcutânea numa dose baixa com libertação lenta de anti-CTLA-4 perto do tumor. Posto isto, houve uma diminuição do anticorpo monoclonal a nível sistémico e diminuindo a toxicidade. Esta abordagem promissora deve continuar a ser estudada (Fransen et al., 2013).

4.2.1.2- PD-1

O bloqueio do *checkpoint* no tratamento do cancro está a ser revolucionário, nomeadamente os anticorpos que bloqueiam a interação entre PD-1/PD-L1 entre as células tumorais e as células T. O recetor de morte celular programada 1 (PD-1) indutor da apoptose das células, pode interagir com dois ligandos; PD-L1 e PD-L2 (Arasanz et al., 2017).

PD-1 é uma proteína transmembranar expressa em várias células imunitárias como as células T, células B e as células NK. PD-L1 pertence à família B7 de moléculas co-inibidoras de apresentação de antigénios, sendo expressa por vários tipos de células, abrangendo as células tumorais (Sharpe et al., 2007; Arasanz et al., 2017).

Similar à interação CD80/CTLA-4, a relação entre PD-1/PD-L1 é igualmente antagonista do CD80-CD28. Quando existe a ligação PD-1/PD-L1, vai inibir fortemente a transdução do sinal do Recetor de Célula T (TCR) e a co-estimulação de CD28, isto

acontece mesmo em níveis baixos de PD-1. Além disso, controla a indução e manutenção das células T periféricas e não permite a produção de citocinas (Chemnitz et al., 2004; Arasanz et al., 2017).

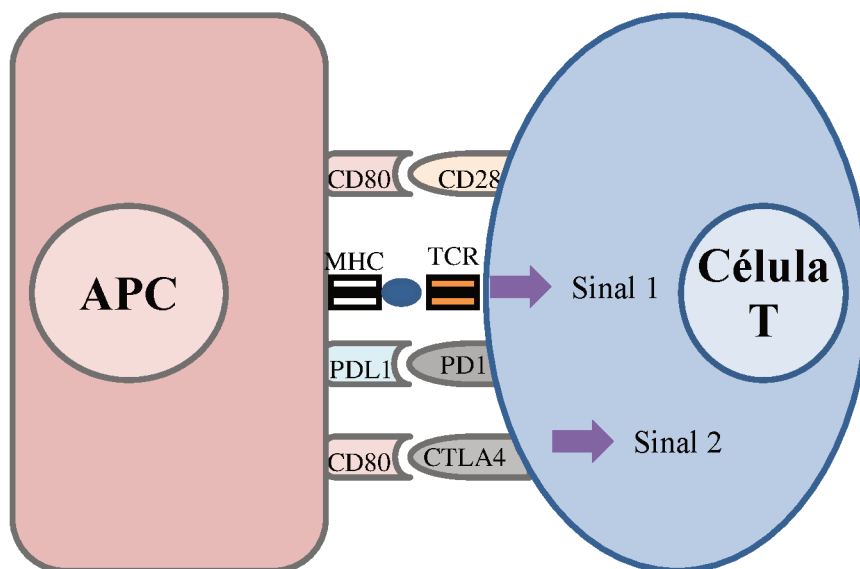


Figura 5: Apresentação de antígenos (adaptado de Arasanz et al., 2017)

As células T recebem três sinais da APC. A APC exhibe os péptidos antigénicos acoplados as moléculas MHC à célula T através da ligação TCR. Esta interação vai desencadear um sinal intracelular (representado na figura pelo sinal 1). As células T recebem concomitantemente sinais positivos e negativos. Na figura primeiramente, observa-se uma ligação entre CD80-CD28 sendo uma interação co-estimulatória. Seguidamente as duas interações abaixo, a ligação PD-1/PD-L1 e CD80/CTLA-4 são inibitórias levando à inibição TCR (representado na figura pelo sinal 2) (Arasanz et al., 2017).

Verificada a sua ação constatou-se que são alvos terapêuticos a utilizar no cancro da mama, o pembrolizumab é um anticorpo monoclonal seletivo contra PD-1. Pode ser usado em monoterapia ou concomitantemente com a quimioterapia. O pembrolizumab encontra-se na Fase Ib no estudo da sua atividade antitumoral no cancro da mama. Este está a ser estudado em pacientes com cancro da mama PD-L1+/ER+/HER2-. PD-L1 raramente é expresso no tecido mamário normal, mas pode ser expresso pelas células tumorais. Num estado avançado localmente ou contendo metástases que já tenha sido

submetido a várias linhas de tratamento, o pembrolizumab demonstrou eficácia em monoterapia no cancro da mama metastático triplo negativo (Rugo et al., 2018).

4.2.1.3- Outros pontos de verificação imunológica

A Imunoglobulina de Células T e Domínio de Mucina 3 (TIM-3) é uma proteína transmembranar existente nas Linfócito T regulador (Tregs) e células T. A proteína TIM-3 é codificada por um gene, sendo agora conhecida por ser uma molécula do checkpoint imunológico. A TIM-3 tem a capacidade de limitar a atividade das células T nomeadamente diminuir a resposta das células T e ativação dos mecanismos de regulação das células T (Sakuishi et al., 2010; Woo et al., 2013).

TIM-3 é capaz de causar a morte celular das células T, através da ligação com o ligando galectina-9. A galectina-9 pode ser encontrada na APC, como por exemplo nos monócitos, macrófagos e células dendríticas. A sua inibição da TIM-3 é importante na resposta antitumoral das células T (Manuscript & Nanobiomaterials, 2013; Gallois et al., 2014).

TIM-3 é expresso simultaneamente com PD-1. Esta dupla expressão provoca maiores falhas na divisão celular e na produção de citocinas, comparativamente às células que expressam apenas PD-1. A co-expressão de TIM e PD-1 também está associada à exaustão dos Linfócitos Infiltrantes do Tumor (TIL) na maioria dos tumores, nomeadamente no cancro da mama. O bloqueio destes dois fatores tem um papel fundamental para a melhoria da imunidade antitumoral (Cheng, Zhang, & Ruangwattanapaisarn, 2016).

O recetor Ativação Linfocitária Gene-3 (LAG-3) é uma molécula do checkpoint imunológico, a sua função é aumentar a atividade das células T reguladoras, aumentando a atividade e proliferação das células T. Este recetor vai ligar-se fortemente as moléculas MHC de classe II, desta forma auxilia a função das células T reguladoras. LAG-3 é co-expresso em células T com PD-1 levando a diminuição do CTL no tumor. Um alvo terapêutico para combater este problema é um agente anti-PD-1 (Cellulaire, Inserm, Gustave-roussey, Desmoulins, & Cedex, 1994; Grosso et al., 2011)

Os fármacos para os alvos terapêutico, TIM-3 e LAG-3, continuam em investigação em fase pré-clínica e clínica. Caso se comprove que o bloqueio destas

moléculas são clinicamente significativas, podem fazer parte do arsenal do checkpoint em pacientes que expressam altos níveis destes ligantes (Cheng et al., 2016)

4.2.2- Vacina antitumorais

A vacinação representa um dos métodos mais eficazes na prevenção de doenças. A prevenção efetuada através da vacinação é o método que permite eliminar a propagação de uma infecção, a sua atividade está relacionada com a indução de anticorpos e células B. As células B são responsáveis pela memória a longo prazo. De outro modo, as vacinas terapêuticas são elaboradas de forma a eliminar a causa da doença, neste caso eliminar as células tumorais (Finn & Edwards, 2009; Pulendran & Ahmed, 2011; Subbarao, Murphy, & Fauci, 2006).

As vacinas anti tumorais têm como principal objetivo atingir respostas terapêuticas muito específicas. A efetividade das vacinas está relacionada com CD8+, essencialmente com os antígenos específicos de forma CTL detetarem e erradicarem as células cancerígenas disseminadas. As vacinas terapêuticas ativam as células T virgens e modulam as células T de memória já existentes, provocando uma indução da transcrição de CD8+ não-protetoras para CD8+ saudáveis produzindo CTL (Palucka & Banchereau, 2013a).

A resposta induzida pelas células T primárias é complementada pela indução de células T memória. As células T memória são mediadoras da memória imunológica, minimizando o risco de recorrências (Kirpich, Marsano, & McClain, 2015).

A identificação de antígenos tumorais mutados e expressos em grande quantidade, permite desenvolver novas estratégias de terapêuticas personalizadas. Terapêuticas essas que podem ser vacinas ou transferência adotiva de forma aumentar a imunorreatividade antitumoral. Posto isto, existem vários tipos de vacinas antitumorais. Os tipos variam dependente da fonte imunogénica, ou seja, podem ser péptidos antígenos altamente expressos pelo tumor, DNA, RNA e vacinas virais. Estas terapêuticas estão a ser estudadas no âmbito do cancro da mama (Moreno Ayala, Gottardo, Asad, et al., 2017).

4.2.2.1- Vacinas de péptidos

Os péptidos imunogénicos são constituídos por pequenas sequências de aminoácidos, proveniente dos antígenos tumorais que se ligam as moléculas MHC nas APC. Este processo vai induzir a resposta do CTL, de forma a detetar e eliminar as células

tumorais que expressem esse antigénio. Os péptidos aptos a serem candidatos, destinam-se às células T CD8+ e CD4+, podem ser apresentados as MHC-1 e MHC-2 receptivamente. Nas células, os péptidos são produzidos através de proteólise de proteínas sintetizadas endogenamente nomeadamente no citosol. Posteriormente são carregadas em moléculas de MHC presentes no retículo endoplasmático e apresentadas à superfície celular para vigilância, efetuada pelas células T CD4+ e CD8+ (Comber & Philip, 2014).

A etapa fundamental no desenvolvimento de uma vacina de péptidos é direcionar para as células T CD4+ e CD8+ para os péptidos corretos. Posteriormente, deverá ser apresentado ao complexo MHC e estimular a proliferação das células T. Os investigadores estão a estudar novas técnicas de rastreio de péptidos, de modo a superar as limitações atuais (Bentzen et al., 2016).

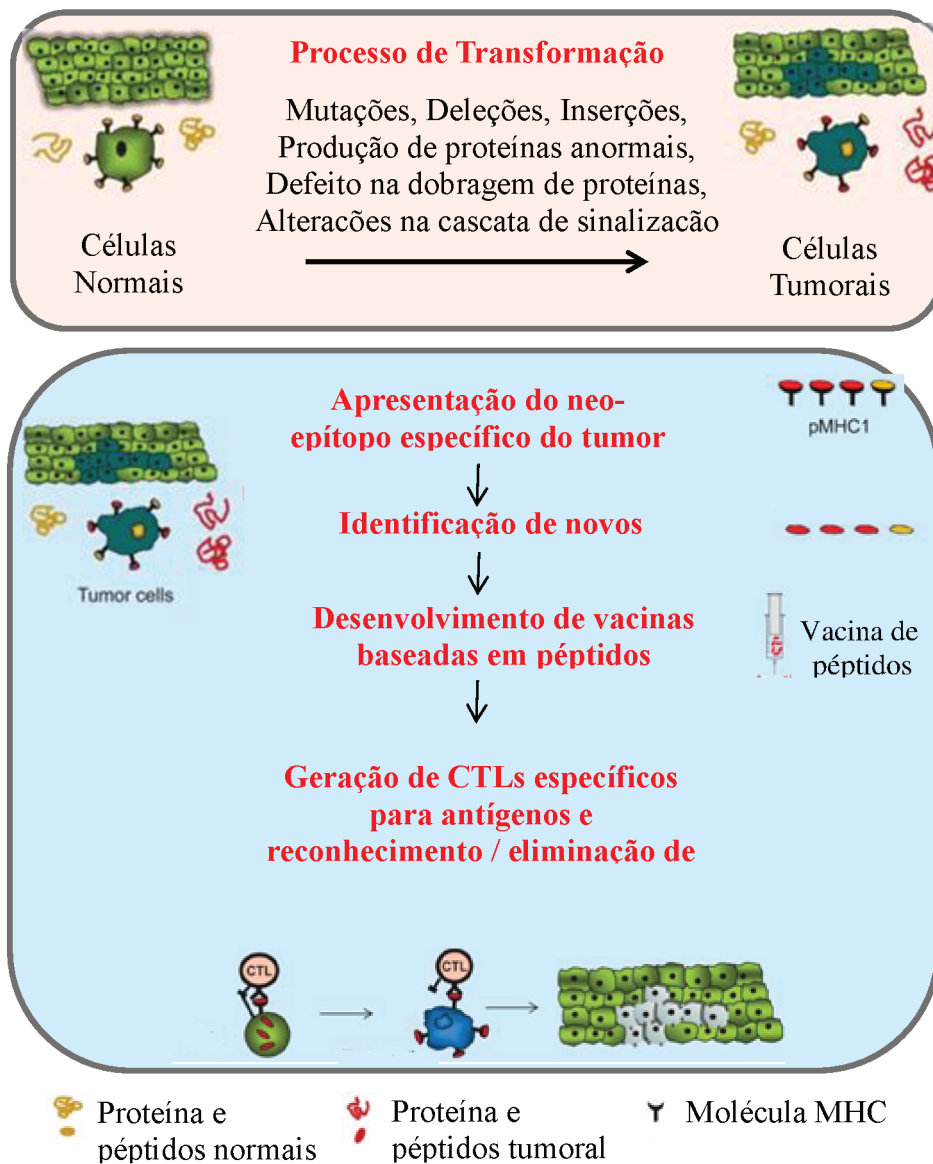


Figura 6: Vacinas de péptidos (adaptado de Comber & Philip, 2014)

O recetor alfa de folato (FR alfa) está presente em cerca de 80% dos cancros da mama triplo negativos, estando associado uma diminuição da sobrevida livre da doença. Foi desenvolvida uma vacina peptídica constituída por 5 epítomos de péptidos imunogénicos para o recetor FR alfa, para a prevenção de recorrências de tumores mamários. A vacina é administrada por via intradérmica, como adjuvante é administrado concomitantemente um fator de crescimento e estimulação (GM-CSF). Deste modo, vai provocar uma resposta citotóxica pelos linfócitos T contra os recetores FR alfa. Esta vacina está a ser testada em combinação com ciclofosfamida em doentes com cancro da mama, que não responderam ao tratamento standard (Zhang et al., 2014).

O HER2 pertence à família do recetor do fator de crescimento epidérmico de tirosina quinase transmembranar, ferramenta essencial para o crescimento e divisão das células saudáveis. A sua expressão excessiva está associada à proliferação anormal das células, tornando-se um biomarcador e um alvo terapêutico, principalmente no cancro da mama. Cerca de 25-30% dos doentes com cancro da mama apresentam esta elevada expressão de HER2, demonstrando um aumento da atividade do tumor sendo um indicador evolutivo desfavorável na doença. As vacinas derivadas de HER2 são uma abordagem aliciante para doentes com cancro da mama HER2+, sendo utilizado na prevenção de recorrências porém ainda se encontram em estudos (Zhu & Verma, 2015).

As vacinas peptídicas induzem uma resposta antitumoral adaptativa, proporcionando uma memória imunológica antitumoral. Apresentando uma vantagem clínica significativa comparativamente aos anticorpos HER2, como o trastuzumab ou pertuzumab. Estes são imunoterapêuticos passivos, ou seja, não geram memória imunológica (Schneble et al., 2014; Moreno Ayala et al., 2017).

Este tipo de vacinas possui uma região imunogénica, o que vai minimizar o risco de reações cruzadas e os efeitos adversos. A ocorrência destes efeitos é mais comum quando são utilizados antígenos inteiros ou lisados tumorais (Paula Peres et al., 2015).

4.2.2.2- Vacinas de DNA

As vacinas de DNA contém um plasmídeo com a capacidade de codificar a transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT). A hTERT é uma enzima ribonucleoproteína que preserva o tamanho e estabilidade do cromossoma, protegendo o DNA. Pode ser encontrado em cerca de 85% das células tumorais apresentando duas mutações imunogénicas. A expressão excessiva correlacionada com a sobrevida e

proliferação das células tumorais (Coveler, Bates, & Disis, 2010; Benedetti, Dell'Aversana, Giorgio, Astorri, & Altucci, 2017; Moreno Ayala et al., 2017).

Após estas descobertas, torna esta vacina um alvo aliciante na imunoterapia, mas ainda existem poucos estudos relativos ao uso desta vacina em pacientes com cancro da mama num estado avançado (Harley, 2008).

Esta vacina é administrada por via intradérmica. Após administração, a proteína hTERT é expressa, por sua vez vai ativar o sistema imunitário provocando uma resposta dos linfócitos T citotóxicos sobre as células tumorais que expressam a telomerase. Demonstrando a capacidade de quebrar a tolerância imunológica proporcionando a morte das células alvo (Coveler et al., 2010; Yan et al., 2013; Benedetti et al., 2017; Moreno Ayala et al., 2017).

A vacina de DNA com plasmídeo têm a capacidade de codificar a citocina pró-inflamatória IL-12, contribui para ativação do sistema imunológico. Desta forma, induz as células NK e promove as células T citotóxicas. Atualmente está a ser estudado o uso da vacina hTERT isolada e em associação com outras terapêuticas (Moreno Ayala, Gottardo, Asad, et al., 2017).

4.2.2.3- Vacinas de Células Dendríticas (DC)

As células dendríticas são essenciais para a vacinação, pela sua capacidade de capturar e apresentar os antígenos às células T. As vacinas com células dendríticas podem ser carregadas com lisados tumorais, antígenos tumorais ou RNA tumoral (Avigan, 2004; Park et al., 2007; Palucka & Banchereau, 2013; Benteyn, Heirman, Bonehill, Thielemans, & Breckpot, 2014).

As vacinas DC são baseadas em precursores de células dendríticas que seguidamente são carregadas com antígenos tumorais, deste modo vão favorecer uma resposta imune direcionada e efetiva (Amedei, Benaglio, Della Bella, Nicolai, & D'Elia, 2011).

Os precursores de DC, como por exemplo monócitos, são isolados a partir do doente. Posteriormente são incubados com citocinas, como a IL-4, impulsionando a diferenciação de monócitos para DC imaturas. Seguidamente é realizada a maturação das células DC imaturas, por intervenção de citocinas pró-inflamatórias. A cerca do carregamento com antígenos tumorais (proteínas, ácidos nucleicos tumorais ou um

simples antígeno alvo) pode acontecer ao mesmo tempo que a maturação ou posteriormente (Figura 7) (Nicolette et al., 2007; Amedei et al., 2011; Farmac, 2013).

Posto isto, quando estão maturadas e carregadas com o antígeno tumoral estão reunidas as condições para iniciar a administração ao doente. Após administração, as células dirigem-se aos tecidos linfóides, ocorrendo uma resposta inata e ativação das células T CD4+ e CD8+. A seguir ativação, as células T migram do tecido linfóide para o tecido tumoral impedindo o seu crescimento (Figura 7) (Bhardwaj, 2010).

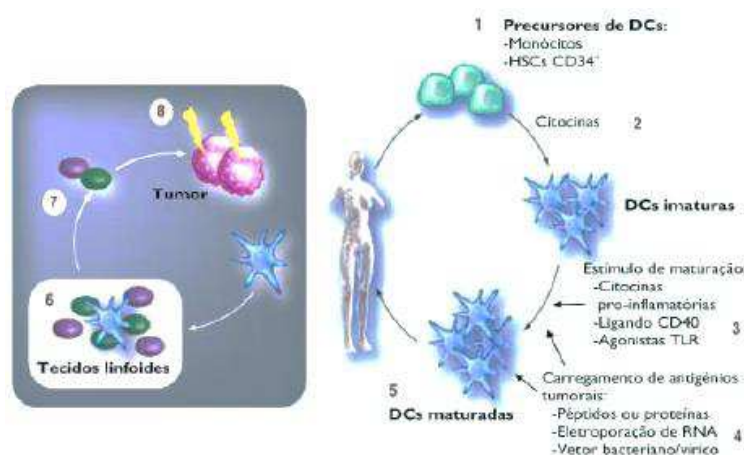


Figura 7: Vacinas DC (retirado de Farmac,2013)

Uma das dificuldades no sucesso deste tipo de vacinas é o desenvolvimento de processos imunossupressores provenientes das células tumorais (Apetoh, Locher, Ghiringhelli, Kroemer, & Zitvogel, 2011).

Derivado ao microambiente tumoral as DC tem a capacidade de adquirir um fenótipo tolerogénico, devido à variedade de moléculas imunossupressoras libertadas contribuindo para a resistência tumoral (Steinman & Banchereau, 2007).

4.2.3- Bloqueio das células T reguladoras

As Treg são células essenciais para a conservação da tolerância periférica. As Treg desempenham um papel importante na fuga imunológica e na resistência à terapêutica. Deste modo, têm aptidão de provocar apoptose e ainda de inibir a proliferação e maturação das células T efetoras (Safinia, Scotta, Vaikunthanathan, Lechler, & Lombardi, 2015).

Os doentes com cancro da mama têm uma elevada expressão de Treg comparativamente com indivíduos sãos. Os níveis de Treg aumentam quando existe a progressão do tumor. A elevada expressão de Treg está associado a uma baixa concentração de células T CD8+, estando associado a um mau prognóstico. Desta forma, tem sido alvo de estratégias para melhorar a imunidade antitumoral devido à sua capacidade de fuga imunológica (Oleinika, Nibbs, Graham, & Fraser, 2013; Nishikawa & Sakaguchi, 2014).

De modo a combater esta problemática é utilizado quimioterapia metronómica, consiste na administração prolongada em baixa dosagem de fármacos quimioterapêuticos convencionais, como por exemplo a ciclofosfamida. Demonstrando um decréscimo das Treg nos pacientes portadores de cancro da mama (Ghiringhelli et al., 2007).

Esta técnica é promissora como tratamento de manutenção em doentes submetidos a quimioterapia. Apesar dos efeitos colaterais da quimioterapia metronómica serem menores comparativamente à quimioterapia tradicional, o uso prolongado desta estratégia terapêutica eleva o risco de desenvolver tumores malignos secundários como a leucemia (Lien, Georgsdottir, Sivanathan, Chan, & Emmenegger, 2013; Maiti, 2014).

Outra forma de bloquear as células Treg é através da Foxp3. Foxp3 é um fator de transcrição expresso pelas Treg, sendo essencial para atividade imunossupressora. O péptido P60 tem a capacidade de penetrar a célula e ligar-se ao Foxp3 inibindo-o (Casares et al., 2010).

Após o estudo destes alvos terapêuticos, foi possível concluir que o bloqueio das células Treg e ao mesmo tempo serem utilizadas as vacinas DC carregadas com lisados tumorais apresentavam uma maior eficácia. Todas as abordagens terapêuticas que abrangem o bloqueio das células Treg implicam um maior risco de efeitos colaterais

(Moreno Ayala, Gottardo, Asad, et al., 2017; Moreno Ayala, Gottardo, Imsen, et al., 2017).

4.2.4-Terapia por transferência de células T adotivas

A terapia por transferência de células T (ATC) consiste na colheita das células T do doente. A ATC fraciona-se em ATC modificadas geneticamente ou ATC de linfócitos infiltrantes, sendo reconhecido o neo-antigénio. Este procedimento é feito com a célula viva. Seguidamente é reintroduzida no doente, tendo a finalidade de induzir imunidade antitumoral (figura 8) (Mitchison NA,1955; Illumina, n.d.; Bonini & Mondino, 2015; Moreno Ayala, Gottardo, Asad, et al., 2017)

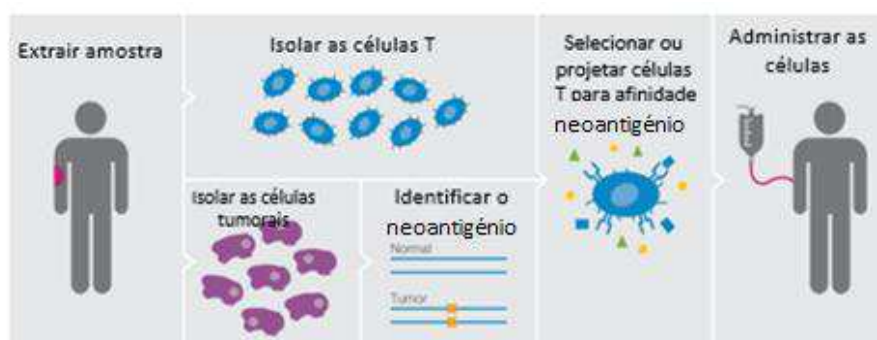


Figura 8: Transferência de células adotivas (adaptado de Illumina, n.d.)

Os estudos realizados para compreender o funcionamento das células T e os seus mecanismos de ativação e maturação conduziram ao desenvolvimento de diversas técnicas, de forma aumentar o sucesso terapêutico *ex vivo*. Inicialmente a estratégia utilizada foi isolar TIL provenientes de amostras tumorais, através da digestão ou desagregação das células tumorais. Os TIL podem ser estimulados por diferentes linhagens de células tumorais tais como, lisados tumorais ou células tumorais do próprio doente. Apenas numa amostra tumoral é possível encontrar uma diversidade de linfócitos com especificidades antigénicas e fenotipicamente distintos (Dudley, Wunderlich, Shelton, Even, & Rosenberg, 2003).

A administração de TIL no melanoma metastático, onde foi verificado os melhores resultados, demonstrou uma regressão do tumor. Contudo, nos doentes com cancro da mama não se verificou uma melhoria clínica (Rosenberg et al., 2011; Stanton & Disis, 2016).

Os avanços em biologia molecular e engenharia genética conduziram ao desenvolvimento de dois novos tipos de ATC. Uma das estratégias está associada à engenharia genética das células T que têm a capacidade de expressar o receptor de antígeno quimérico (CAR). O CAR é constituído por um domínio de ligação do anticorpo com um alvo antigénico localizado no tumor. A segunda estratégia consiste nas cadeias α e β das células T, sendo ambas específicas para o antígeno ($\alpha\beta$ TCR). Em ambos os casos, as células T vão atuar sobre os antígenos tumorais alvo. A diferença entre estas estratégias terapêuticas é a dependência da expressão de MHC nas células alvo, sendo que os CAR não são dependentes da expressão de MHC. O método baseado $\alpha\beta$ TCR é dependente de MHC, assim este método TCR apresenta uma vantagem de permitir atacar o antígeno na superfície celular ou intracelular (Kalos & June, 2013).

Em suma, na transferência de células T adotivas as células T encontram-se em circulação ou infiltradas no interior do tumor e são coletadas. Se for extraído células T circulantes podem ser utilizadas duas técnicas; (A) As células T são cultivadas e multiplicadas e são novamente administradas ao doente e concomitantemente é administrada elevadas doses de IL-2, (B) as células T são manipuladas de forma a expressarem CAR ou TCR e por fim em (C) quando são utilizados os TILs são selecionados e multiplicados e são novamente introduzidos no doente (Figura 7) (Moreno Ayala, Gottardo, Asad, et al., 2017).

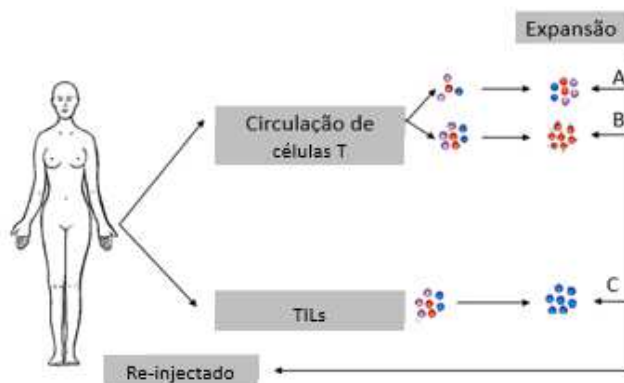


Figura 9: Terapia por transferência de células T adotivas (adaptado de Moreno Ayala, Gottardo, Asad, et al., 2017)

De maneira a melhorar a efetividade desta terapêutica continua a ser estudada, principalmente no reconhecimento de antígenos de regressão tumoral, controlo do tumor e biomarcadores. Numa futura geração de sequenciamento de TCR pode ser uma ferramenta que pode auxiliar a infiltração de células T e definir biomarcadores (Hinrichs & Rosenberg, 2014; Poschke, Flossdorf, & Offringa, 2016).

O ATC é um tratamento personalizado, sendo possível selecionar diversas abordagens dependendo do caso, variando de indivíduo para indivíduo (Rosenberg et al., 2011; Moreno Ayala, Gottardo, Asad, et al., 2017).

4.2.5-Imunoterapia adotiva

Nos casos de cancro da mama HER2 positivo a terapêutica mais utilizada é anticorpos monoclonais como o trastuzumab. FDA em 1998 aprovou o trastuzumab, como o primeiro anticorpo monoclonal de IgG específico para atingir as células tumorais com a capacidade de expressar HER2. Este fármaco tem a capacidade de se ligar e bloquear HER2, desta maneira vai inibir outras vias (MAPK, PI3K/Akt) responsáveis pelo crescimento e proliferação tumoral (Vu & Claret, 2012).

Ao adicionar células otimizadas pelo trastuzumab podem reconhecer e matar por toxicidade celular, dependente dos anticorpos provenientes das células NK. A combinação deste fármaco com a quimioterapia em doentes com cancro da mama diminui consideravelmente a progressão tumoral e aumenta a sobrevida. Assim foi designado como tratamento padrão para doentes portadores de cancro da mama HER2+ (Slamon DJ et al., 2001; Arnould et al., 2006).

O pertuzumab foi aprovado pela FDA em combinação com o trastuzumab e com a quimioterapia, em doentes com cancro da mama HER2+. No ensaio CLEOPATRA, foi estudado o uso do pertuzumab com o trastuzumab e docetaxel, foi possível comprovar uma melhoria significativa de 38% no risco de morte em comparação ao tratamento padrão (Baselga et al., 2010; D. Jiang, Niwa, Koong, & Diego, 2015).

Uma nova classe de medicamentos designada por anticorpo-conjugado de fármaco. O primeiro fármaco desta classe foi o trastuzumab-emtansina (TDM-1). Este novo fármaco combina a efetividade do anticorpo monoclonal (trastuzumab) com a capacidade citotóxica da quimioterapia (emtansina). O trastuzumab vai ligar-se especificamente ao HER2 e o emtansina tem a capacidade de entrar no interior da célula.

Esta terapêutica é mais efetiva e apresenta menos efeitos adversos, esta conclusão foi baseada no estudo EMILIA que se encontra na fase III (Verma et al., 2012).

Capítulo V- Imunoterapia e Quimioterapia

A quimioterapia tem sido o tratamento mais utilizado, com a finalidade de exercer uma ação imunossupressora e pela sua eficácia a nível citotóxico. Contudo, nos últimos anos foi possível verificar que a quimioterapia pode provocar mudanças imunológicas. Esta terapia pode provocar a morte imunogénica, havendo a possibilidade de aumentar as moléculas pró-inflamatórias no microambiente tumoral. No decorrer da morte celular acontecem mudanças a nível da composição da membrana plasmática, exibindo calreticulina, a proteína do choque térmico 90 (HSP90) e moléculas pró-inflamatórias intracelulares (ATP, HSP70 e HMGB1) (Rasmussen & Arvin, 1982; Kroemer, Galluzzi, Kepp, & Zitvogel, 2013).

As moléculas pró-inflamatórias vão exercer uma função de ligando do recetor *Toll-like* (TLR), deste modo induzem ativação das células DC no microambiente tumoral. Posto isto, facilita *cross-priming* e a expansão clonal de células T específicas para tumores (Mahmood, Rajasekar, Bora, & Andrali, 2015).

A ligação entre TLR4 e HMGB1 exerce um papel revelante na eficácia da quimioterapia. Os doentes com cancro da mama que demonstram uma perda nos alelos TLR4 é indicador de mau prognóstico após quimioterapia adjuvante (Ladoire, Enot, Andre, Zitvogel, & Kroemer, 2016).

A utilização de substâncias quimioterapêuticas no cancro da mama como por exemplo, os taxanos e o docetaxel. Estes fármacos provocam um aumento da infiltração de células T no interior do tumor. A presença IFN- γ produzida por TIL bem como o ratio TILs CD8+ *versus* Treg prevêm um prognóstico mais favorável à quimioterapia (Demaria et al., 2001; Tsavaris, Kosmas, Vadiaka, Kanelopoulos, & Boulamatsis, 2002).

Concluindo, é necessário criar estratégias terapêuticas que combinem a quimioterapia com a imunoterapia. Visto que o IFN- γ atua na expressão PD-L1, tornando os tumores mais sensíveis ao bloqueio do *checkpoint*. Foi possível verificar que doentes com cancro da mama sem TIL após tratamento de quimioterapia apresentavam TIL. Apresentando uma maior sensibilidade para o bloqueio do *checkpoint* e uma resposta à terapêuticas mais duradora (Pfirschke et al., 2016).

Capítulo VI- Conclusão

O cancro da mama foi considerado durante muito anos como um tumor não imunogénico, posto isto, o desenvolvimento e aplicabilidade da imunoterapia foi adiada durante anos. As evidências demonstraram que a falha da resposta imunológica favorece os mecanismos de escape promovendo a progressão do tumor.

Os tumores mamários apresentam elevados níveis de CTLA-4, PD-1, PD-L1, TREG e TAM. Todos eles podem ser utilizados como alvos terapêuticos com capacidade de melhorar a imunidade antitumoral. Como os tumores mamários exibem múltiplos mecanismos de imunossupressão, abrem portas para a combinação de várias terapêuticas, como por exemplo a combinação das vacinas antitumorais com inibição de Treg ou bloqueio do *checkpoint*.

Os mecanismos imunossupressores podem variar de indivíduo para indivíduo, sendo essencial determinar os biomarcadores e os antígenos tumorais, de forma a prever a eficácia do tratamento.

Ao longo de muitos anos, a quimioterapia foi tradicionalmente utilizada e considerada como imunossupressora, sendo inapropriada para a utilização concomitante com a imunoterapia. Após exaustivos estudos, demonstraram que este paradigma está errado, a quimioterapia melhora a eficácia de muitas abordagens imunoterapêuticas. Continuam a ser testado a utilização da imunoterapia e a quimioterapia, o que ajudaria a melhorar a imunidade antitumoral e a reduzir doses ou a duração da quimioterapia. Desde modo, diminuir a gravidade dos efeitos secundários provenientes do tratamento.

Concluindo, existem evidências que demonstram que o cancro da mama é um forte candidato para a utilização da imunoterapia. Continuam a ser estudadas estratégias imunoterapêuticas múltiplas, como a utilização de anticorpos monoclonais que bloqueiam o *checkpoint* imunológico, antígenos associados ao tumor, vacinas antitumorais ou a manipulação de células T. Posto isto, as estratégias imunoterapêuticas anteriormente rejeitadas para o tratamento do cancro da mama, agora surgem como novas ferramentas no combate esta neoplasia.

Capítulo VII-Bibliografia

- Amedei, A., Benagiano, M., Della Bella, C., Nicolai, E., & D'Elia, M. M. (2011). Novel immunotherapeutic strategies of gastric cancer treatment. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/437348>
- American Cancer Society. (2013). Breast Cancer Facts & Figures 2012-2014. *Breast Cancer Facts & Figures*, 1–44. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2018-4>.Mesothelin
- Andrade, C., & Ferreira, B. (2016). A saúde dos portugueses 2016. *Direção-Geral Da Saúde (DGS), Sistema Nacional de Saúde (SNS)*. Retrieved from [https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/18278/1/A Saude dos Portugueses 2016.pdf](https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/18278/1/A_Saude_dos_Portugueses_2016.pdf)
- Andreini P, Drasher ML, M. N. (1955). Studies on the immunological response to foreign tumor transplants in the mouse. III. Changes in the weight, and content of nucleic acids and protein, of host lymphoid tissues. *Rockefeller University Pres.* <https://doi.org/10.1084/jem.102.2.199>
- Apetoh, L., Locher, C., Ghiringhelli, F., Kroemer, G., & Zitvogel, L. (2011). Harnessing dendritic cells in cancer. *Seminars in Immunology*, 23(1), 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2011.01.003>
- Apolinário, C. L. dos S. (2012). Farmacoterapia no Cancro da Mama. *Universidade Do Algarve*. Retrieved from [https://sapientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/3521/1/Farmacoterapia no cancro da mama-2012.pdf](https://sapientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/3521/1/Farmacoterapia_no_cancro_da_mama-2012.pdf)
- Apostolou, P., & Fostira, F. (2013). Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *Biomed Res Int*, 2013, 747318. <https://doi.org/10.1155/2013/747318>
- Arasanz, H., Gato-cañas, M., Zuazo, M., Ibañez-vea, M., Kochan, G., & Escors, D. (2017). PD1 signal transduction pathways in T cells. *University College London*, 8(31), 51936–51945. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17232>
- Arnould, L., Gelly, M., Penault-Llorca, F., Benoit, L., Bonnetain, F., Migeon, C., ... Coudert, B. (2006). Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: An antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *British Journal of Cancer*, 94(2), 259–267. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602930>
- Avigan, D. (2004). Fusion Cell Vaccination of Patients with Metastatic Breast and Renal Cancer Induces Immunological and Clinical Responses. *Clinical Cancer Research*,

- 10(14), 4699–4708. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0347>
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., ... Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 18(1), 767–811. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.767>
- Baselga, J., Gelmon, K. A., Verma, S., Wardley, A., Conte, P. F., Miles, D., ... Gianni, L. (2010). Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 28(7), 1138–1144. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.2024>
- Benedetti, R., Dell'Aversana, C., Giorgio, C., Astorri, R., & Altucci, L. (2017). Breast cancer vaccines: New insights. *Frontiers in Endocrinology*, 8(OCT), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00270>
- Benteyn, D., Heirman, C., Bonehill, A., Thielemans, K., & Breckpot, K. (2014). mRNA-based dendritic cell vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 14(2), 161–176. <https://doi.org/10.1586/14760584.2014.957684>
- Bentzen, A. K., Marquard, A. M., Lyngaa, R., Saini, S. K., Ramskov, S., Donia, M., ... Hadrup, S. R. (2016). Large-scale detection of antigen-specific T cells using peptide-MHC-I multimers labeled with DNA barcodes. *Nature Biotechnology*, 34(10), 1037–1045. <https://doi.org/10.1038/nbt.3662>
- Berruti, A., Bitossi, R., Bottini, A., Bonardi, S., Donadio, M., Nigro, C., ... Dogliotti, L. (2005). Combination regimen of epirubicin, vinorelbine and 5-fluorouracil continuous infusion as first-line chemotherapy in anthracycline-naïve metastatic breast cancer patients. *European Journal of Cancer*, 41(2), 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.07.003>
- Bertrand, A., Kostine, M., Barnetche, T., Truchetet, M. E., & Schaeffer, T. (2015). Immune related adverse events associated with anti-CTLA-4 antibodies: Systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine*, 13(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0455-8>
- Bhardwaj, R. L. S. and N. (2010). Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment. *British Medical Journal*, 1(4771), 1301. <https://doi.org/10.2217/imt.09.43.Directing>
- Birnbaum, D., Bertucci, F., Ginestier, C., Tagett, R., Jacquemier, J., & Charafe-Jauffret, E. (2004). Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? (review). *International Journal of Oncology*, 25(2), 249–258.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.3892/ijo.25.2.249>
- Blick, T., Widodo, E., Hugo, H., Waltham, M., Lenburg, M. E., Neve, R. M., & Thompson, E. W. (2008). Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines. *Clinical and Experimental Metastasis*, 25(6), 629–642. <https://doi.org/10.1007/s10585-008-9170-6>
- Bonecchi, R., Galliera, E., Borroni, E. M., Corsi, M. M., Locati, M., & Mantovani, A. (2009). Chemokines and chemokine receptors: an overview. *Frontiers in Bioscience*, 540–551. <https://doi.org/10.2741/3261>
- Bonini, C., & Mondino, A. (2015). Adoptive T-cell therapy for cancer: The era of engineered T cells. *European Journal of Immunology*, 45(9), 2457–2469. <https://doi.org/10.1002/eji.201545552>
- Bonnomet, A., Brysse, A., Tachsidis, A., Waltham, M., Thompson, E. W., Polette, M., & Gilles, C. (2010). Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 15(2), 261–273. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9174-0>
- Brewer, H. R., Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Ashworth, A., & Swerdlow, A. J. (2017). Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Research and Treatment*, 165(1), 193–200. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4325-2>
- Calder, P. C. (2013). Feeding the immune system. *Proceedings of the Nutrition Society*, 72(3), 299–309. <https://doi.org/10.1017/S0029665113001286>
- Campbell, S., Ph, D., Reeves, D., Ph, D., Kontopantelis, E., Ph, D., ... Roland, M. (2007). The Decrease in Breast-Cancer Incidence in 2003 in the United States. *The New England Journal of Medicine*, 181–190. <https://doi.org/10.1056/NEJMSr070105>
- Cardoso, F. (2011). 100 Perguntas Chave no Cancro da mama. *Sociedade Portuguesa de Oncologia*, <https://www.sponcologia.pt/fotos/editor2/publicaco>.
- Casares, N., Rudilla, F., Arribillaga, L., Llopiz, D., Riezu-Boj, J. I., Lozano, T., ... Lasarte, J. J. (2010). A Peptide Inhibitor of FOXP3 Impairs Regulatory T Cell Activity and Improves Vaccine Efficacy in Mice. *The Journal of Immunology*, 185(9), 5150–5159. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001114>
- Catsburg, C., Miller, A. B., & Rohan, T. E. (2015). Active cigarette smoking and risk of breast cancer. *International Journal of Cancer*, 136(9), 2204–2209. <https://doi.org/10.1002/ijc.29266>
- Cellulaire, I., Inserm, U., Gustave-roussey, I., Desmoulins, C., & Cedex, V. (1994).

- Cellular expression and tissue distribution of the human LAG-3-encoded protein, an MHC class II ligand. *Immuno-Genetics*, 213–214. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00241263>
- Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H., & Riley, J. L. (2004). SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *The Journal of Immunology*, 173(2), 945–954. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.945>
- Cheng, J. Y., Zhang, T., & Ruangwattanapaisarn, N. (2016). Personalized Oncology Meets Immunology: The Path Towards Precision Immunotherapy. *Cancer Discov*, 42(2), 407–420. <https://doi.org/10.1002/jmri.24785>.Free-Breathing
- Chung, Y.-C., & Chang, Y.-F. (2003). Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 83(4), 222–226. <https://doi.org/10.1002/jso.10269>
- Coghin, Caroline and Murray, G. (2010). Current and emerging concepts in neuroprotection. *Wiley InterScience*, (June), 63. <https://doi.org/10.1002/path.2727>
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30(7), 1073–1081. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp127>
- Comber, J. D., & Philip, R. (2014). MHC class I antigen presentation and implications for developing a new generation of therapeutic vaccines. *Therapeutic Advances in Vaccines*, 2(3), 77–89. <https://doi.org/10.1177/2051013614525375>
- Coveler, A., Bates, N., & Disis, M. (2010). Progress in the development of a therapeutic vaccine for breast cancer. *Dovepress*, 25–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3846461/>
- Dall, G. V., & Britt, K. L. (2017). Estrogen Effects on the Mammary Gland in Early and Late Life and Breast Cancer Risk. *Frontiers in Oncology*, 7(May), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00110>
- Delves, P. J., Roitt, I. M., Mackay, I. R., & Rosen, F. S. (2000). The Immune System. *New England Journal of Medicine*, 343(1), 37–49. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007063430107>
- Demaria, S., Volm, M. D., Shapiro, R. L., Yee, H. T., Oratz, R., Formenti, S. C., ... Symmans, W. F. (2001). Development of Tumor-infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer after Neoadjuvant Paclitaxel Chemotherapy Development of Tumor-

- infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer after Neoadjuvant Paclitaxel Chemotherapy 1. *Clinical Cancer Research*, 7(October), 3025–3030. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=11595690>
- DGS. (2007). Recomendações nacionais para diagnóstico e tratamento do cancro da mama 09. *Direção-Geral Da Saúde (DGS)*. Retrieved from www.arscentro.min-saude.pt/SaudePublica/.../Apresentação DDmed2 a.pdf
- Direcção-Geral da Saúde. (2017). Programa Nacional para as Doenças Oncológicas 2017. <https://doi.org/ISSN: 2183-0746>
- Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Shelton, T. E., Even, J., & Rosenberg, S. A. (2003). Generation of Tumor-Infiltrating Lymphocyte Cultures for Use in Adoptive Transfer Therapy for Melanoma Patients. *Journal of Immunotherapy*, 26(4), 332–342. <https://doi.org/10.1097/00002371-200307000-00005>
- Eduardo Coelho Andrade Rua Botucatu, L., de Melo Cruvinel, W., Mesquita Júnior, D., Antônio Pereira Araújo, J., Tiekao Takao Catelan, T., Wagner Silva de Souza, A., ... Eduardo Coelho Andrade, L. (2010). Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Universidade Federal de São Paulo*, 50(4), 434–61. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000400008>
- Enjeti, a K., Seldon, M., & Braye, S. (2005). Bilateral breast lumps in a patient after sex mismatched allogeneic transplantation for aplastic anaemia. *Journal of Clinical Pathology*, 58(6), 670–671. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=15917426>
- Farag, M. (2015). Can aspirin and cancer prevention be ageless companions? *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(1). <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/9375.5391>
- Farmac, A. (2013). Anti-tumor immunotherapy dendritic cells. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 2, 105–119. Retrieved from <http://www.actafarmacaportuguesa.com/index.php/afp/article/view/6>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Finn, O. J., & Edwards, R. P. (2009). Human Papillomavirus Vaccine for Cancer Prevention. *The New England Journal of Medicine*, 1899–1901.

- <https://doi.org/10.1056/NEJMe0907480>
- Fransen, M. F., Van Der Sluis, T. C., Ossendorp, F., Arens, R., & Melief, C. J. M. (2013). Controlled local delivery of CTLA-4 blocking antibody induces CD8+T-cell-dependent tumor eradication and decreases risk of toxic side effects. *Clinical Cancer Research*, *19*(19), 5381–5389. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0781>
- Friedl, P., & Wolf, K. (2008). Tube travel: The role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Research*, *68*(18), 7247–7249. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0784>
- Gaiotti, D., Chung, J., Iglesias, M., Nees, M., Baker, P. D., Evans, C. H., & Woodworth, C. D. (2000). Tumor necrosis factor- α promotes human papillomavirus (HPV) E6/E7 RNA expression and cyclin-dependent kinase activity in HPV-immortalized keratinocytes by a ras-dependent pathway. *Molecular Carcinogenesis*, *27*(2), 97–109. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2744\(200002\)27:2<97::AID-MC5>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2744(200002)27:2<97::AID-MC5>3.0.CO;2-V)
- Gallimore, A. M., & Simon, A. K. (2008). Positive and negative influences of regulatory T cells on tumour immunity. *Oncogene*, *27*(45), 5886–5893. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.269>
- Gallois, A., Silva, I., Osman, I., & Bhardwaj, N. (2014). Reversal of natural killer cell exhaustion by TIM-3 blockade. *OncoImmunology*, *3*(12), 1–3. <https://doi.org/10.4161/21624011.2014.946365>
- Ghiringhelli, F., Menard, C., Puig, P. E., Ladoire, S., Roux, S., Martin, F., ... Chauffert, B. (2007). Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *56*(5), 641–648. <https://doi.org/10.1007/s00262-006-0225-8>
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2011). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, *140*(6), 883–899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- Grosso, J. F., Goldberg, M. V, Getnet, D., Bruno, T. C., Pyle, K. J., Hipkiss, E., ... Drake, G. (2011). Functionally Distinct LAG-3 and PD-1 Subsets on Activated and Chronically Stimulated CD8 T Cells. *J Immunol*, *182*(11), 6659–6669. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804211>
- Guarino, M., Rubino, B., & Ballabio, G. (2007). The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology*, *39*(3), 305–318. <https://doi.org/10.1080/00313020701329914>

- Ha, N. H., Faraji, F., & Hunter, K. W. (2013). Mechanisms of metastasis. *Cancer Targeted Drug Delivery: An Elusive Dream*, 435–458. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7876-8-17>
- Haldosén, L. A., Zhao, C., & Dahlman-Wright, K. (2014). Estrogen receptor beta in breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 665–672. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.08.005>
- Harley, C. B. (2008). Telomerase and cancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, 8(3), 167–179. <https://doi.org/10.1038/nrc2275>
- Harmey, J. H., Bucana, C. D., Lu, W., Byrne, A. M., McDonnell, S., Lynch, C., ... Dong, Z. (2002). Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion. *International Journal of Cancer*, 101(5), 415–422. <https://doi.org/10.1002/ijc.10632>
- Hinrichs, C. S., & Rosenberg, S. A. (2014). Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. *Immunol*, 257(1), 56–71. <https://doi.org/10.1111/imr.12132>. Exploiting
- Hussain, S. P., Hofseth, L. J., & Harris, C. C. (2003). Radical causes of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(4), 276–285. <https://doi.org/10.1038/nrc1046>
- Illumina. (2016). Immunotherapy , the Next Generation of Cancer Treatment. *Illumina*. Retrieved from <http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appspotlights/ngs-immuno-oncology-application-spotlight-1170-2016-005.pdf>
- Jiang, D., Niwa, M., Koong, A. C., & Diego, S. (2015). Pertuzumab, Trastuzumab, and Docetaxel in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 49(1), 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.04.010>. Targeting
- Jung, S., Wang, M., Anderson, K., Baglietto, L., Bergkvist, L., Bernstein, L., ... Smith-Warner, S. A. (2016). Alcohol consumption and breast cancer risk by estrogen receptor status: In a pooled analysis of 20 studies. *International Journal of Epidemiology*, 45(3), 916–928. <https://doi.org/10.1093/ije/dyv156>
- Kai, H., Kitadai, Y., Kodama, M., Cho, S., Kuroda, T., Ito, M., ... Chayama, K. (2005). Involvement of proinflammatory cytokines IL-1beta and IL-6 in progression of human gastric carcinoma. *Anticancer Research*, 25(2A), 709–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15868900>
- Kalos, M., & June, C. H. (2013). Adoptive T cell Transfer for cancer immunotherapy in

- the era of synthetic biology. *Immunity*, 39(1), 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.002>. Adoptive
- Kim, R. (2007). Cancer Immunoediting: From Immune Surveillance to Immune Escape. *Immunotherapy*, 9–27. <https://doi.org/10.1016/B978-012372551-6/50066-3>
- Kirpich, I. A., Marsano, L. S., & McClain, C. J. (2015). *Gut-liver axis, nutrition, and non-alcoholic fatty liver disease. Clinical Biochemistry* (Vol. 48). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.06.023>
- Koebel, C. M., Vermi, W., Swann, J. B., Zerafa, N., Rodig, S. J., Old, L. J., ... Schreiber, R. D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*, 450(7171), 903–907. <https://doi.org/10.1038/nature06309>
- Kraus, S., & Arber, N. (2009). Intestinal Inflammation and Colorectal Cancer. *Curr Opin Pharmacol*, 9, 405–410. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.06.006>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., & Zitvogel, L. (2013). Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annual Review of Immunology*, 31(1), 51–72. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100008>
- Kryczek, I., Banerjee, M., Cheng, P., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., ... Zou, W. (2009). Plenary paper Phenotype , distribution , generation , and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood Journal*, 114(6), 1141–1150. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-208249>. An
- Ladoire, S., Enot, D., Andre, F., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2016). Immunogenic cell death-related biomarkers: Impact on the survival of breast cancer patients after adjuvant chemotherapy. *OncImmunity*, 5(2), 1–3. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1082706>
- Lakkis, K. M. Y. and F. G. (2015). A brief journey through the immune system. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(7), 1274–1281. <https://doi.org/10.2215/CJN.10031014>
- Li, D.-M., & Feng, Y.-M. (2011). Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potential therapeutic targets. *Breast Cancer Research and Treatment*, 128(1), 7–21. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1499-x>
- Lien, K., Georgsdottir, S., Sivanathan, L., Chan, K., & Emmenegger, U. (2013). Low-dose metronomic chemotherapy: A systematic literature analysis. *European Journal of Cancer*, 49(16), 3387–3395. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.06.038>
- Maccalli, C., Scaramuzza, S., & Parmiani, G. (2009). TNK cells (NKG2D+ CD8+ or CD4+ T lymphocytes) in the control of human tumors. *Cancer Immunology*,

- Immunotherapy* : *CII*, 58(5), 801–8. <https://doi.org/10.1007/s00262-008-0635-x>
- Mahmood, A., Rajasekar, S., Bora, C., & Andrali, S. S. (2015). Synergistic Effect of Dendritic Cell Vaccine with Immune Modulating Chemo Drugs, 3(12).
- Maiti, R. (2014). Metronomic chemotherapy. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 5(3), 186. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.136098>
- Makarem, N., Chandran, U., Bandera, E. V., & Parekh, N. (2013). Dietary Fat in Breast Cancer Survival. *Annual Review of Nutrition*, 33(1), 319–348. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-112912-095300>
- Manuscript, A., & Nanobiomaterials, B. (2013). Designing Tomorrow's Vaccines. *N Engl J Med*, 6(8), 251–256. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1204186>
- McNutt, M., & Couzin-Frankel, J. (2013). Cancer Immunotherapy. *Science*, 342(6165), 1417–1417. <https://doi.org/10.1126/science.1249481>
- McSherry, E. A., Donatello, S., Hopkins, A. M., & McDonnell, S. (2007). Molecular basis of invasion in breast cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(24), 3201–3218. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7388-0>
- Mego, M., Mani, S. A., & Cristofanilli, M. (2010). Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7(12), 693–701. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.171>
- Meira, L., Bugni, J., & Green, S. (2008). DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(7), 2516–2525. <https://doi.org/10.1172/JCI35073.2516>
- Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases- elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, 27, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004.New>
- Moreno Ayala, M. A., Gottardo, M. F., Asad, A. S., Zuccato, C., Nicola, A., Seilicovich, A., & Candolfi, M. (2017). *Immunotherapy for the treatment of breast cancer. Expert Opinion on Biological Therapy* (Vol. 17). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1324566>
- Moreno Ayala, M. A., Gottardo, M. F., Imsen, M., Asad, A. S., Bal de Kier Joffé, E., Casares, N., ... Candolfi, M. (2017). Therapeutic blockade of Foxp3 in experimental breast cancer models. *Breast Cancer Research and Treatment*, 166(2), 393–405. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4414-2>
- Nicolette, C. A., Healey, D., Tcherepanova, I., Whelton, P., Monesmith, T., Coombs, L.,

- ... Miesowicz, F. (2007). Dendritic cells for active immunotherapy: Optimizing design and manufacture in order to develop commercially and clinically viable products. *Vaccine*, 25(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.06.006>
- Nishikawa, H., & Sakaguchi, S. (2014). Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*, 27(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.12.005>
- Oleinika, K., Nibbs, R. J., Graham, G. J., & Fraser, A. R. (2013). Suppression, subversion and escape: The role of regulatory T cells in cancer progression. *Clinical and Experimental Immunology*, 171(1), 36–45. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04657.x>
- Oncol, R., Editado, N., & Gentil, P. F. (2010). Registo Oncológico Nacional. *Registo Oncológico Regional Do Norte*. Retrieved from http://www.roreno.com.pt/images/stories/pdfs/ro_nacional_2010.pdf
- Palucka, K., & Banchereau, J. (2013a). D. *Immunity*, 39(1), 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.004>. Dendritic
- Palucka, K., & Banchereau, J. (2013b). Dendritic-Cell-Based Therapeutic Cancer Vaccines. *Immunity*, 39(1), 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.004>
- Paňková, K., Rösel, D., Novotný, M., & Brábek, J. (2010). The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(1), 63–71. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0132-1>
- Park, J. W., Melisko, M. E., Esserman, L. J., Jones, L. A., Wollan, J. B., & Sims, R. (2007). Treatment with autologous antigen-presenting cells activated with the HER-2-based antigen lapuleucel-T: Results of a phase I study in immunologic and clinical activity in HER-2-overexpressing breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25(24), 3680–3687. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.10.5718>
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Immunology*, 357, 1777–1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
- Paula Peres, L., da Luz, F. A. C., dos Anjos Pultz, B., Brígido, P. C., de Araújo, R. A., Goulart, L. R., & Silva, M. J. B. (2015). Peptide vaccines in breast cancer: The immunological basis for clinical response. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1868–1877. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.10.013>
- Pfirschke, C., Engblom, C., Rickelt, S., Cortez-retamozo, V., Garris, C., Pucci, F., ... Pittet, M. J. (2017). Immunogenic chemotherapy sensitizes tumors to checkpoint

- blockade therapy. *Immunity*, 44(2), 343–354. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.11.024>. Immunogenic
- Poschke, I., Flossdorf, M., & Offringa, R. (2016). Next-generation TCR sequencing – a tool to understand T-cell infiltration in human cancers. *Journal of Pathology*, 240(4), 384–386. <https://doi.org/10.1002/path.4800>
- Provenzano, P. P., Inman, D. R., Eliceiri, K. W., Trier, S. M., & Keely, P. J. (2008). Contact guidance mediated three-dimensional cell migration is regulated by Rho/ROCK-dependent matrix reorganization. *Biophysical Journal*, 95(11), 5374–5384. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.133116>
- Pulendran, B., & Ahmed, R. (2011). Immunological mechanisms of vaccination. *Nature Immunology*, 12(6), 509–517. <https://doi.org/10.1038/ni.2039>
- Rasmussen, L., & Arvin, A. (1982). Chemotherapy-induced immunosuppression. *Environmental Health Perspectives*, 43(February), 21–25. <https://doi.org/10.1289/ehp.824321>
- Rebelo, V., Rolim, L., Carqueja, E., & Ferreira, S. (2007). Avaliação da qualidade de vida em mulheres com cancro da mama: Um estudo exploratório com 60 mulheres portuguesas. *Psicologia, Saúde & Doenças*, 8(1), 13–32. Retrieved from <http://www.scielo.mec.pt/pdf/psd/v8n1/v8n1a02.pdf>
- Ribeiro, J. I. (2014). Carcinoma Da Mama : Estado-da-arte. *Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias*, 39. Retrieved from [https://repositorio.ismai.pt/bitstream/10400.24/247/1/TESE COMPLETA JOANA DUARTE.pdf](https://repositorio.ismai.pt/bitstream/10400.24/247/1/TESE%20COMPLETA%20JOANA%20DUARTE.pdf)
- Ricardo, J., Almeida, C. De, Pedrosa, N. D. L., Leite, J. B., & Ribeiro, T. (2007). Marcadores Tumorais : Revisão de Literatura Tumor Markers : a Literature Review. *Oncologia*, 53(3), 305–316. <https://doi.org/10.1503/cmaj.121368>
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., Kammula, U. S., Marybeth, S., Phan, G. Q., ... Dudley, M. E. (2011). Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T Cell Transfer Immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, 17(13), 4550–4557. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0116>. Durable
- Rovera, F., Chiappa, C., Coglitore, A., Baratelli, G. M., Fachinetti, A., Marelli, M., ... Dionigi, R. (2013). Management of breast cancer during pregnancy. *International Journal of Surgery*, 11(S1), S64–S68. [https://doi.org/10.1016/S1743-9191\(13\)60020-5](https://doi.org/10.1016/S1743-9191(13)60020-5)

- Rugo, H. S., Delord, J.-P., Im, S.-A., Ott, P. A., Piha-Paul, S. A., Bedard, P. L., ... Tan, A. R. (2018). Safety and Antitumor Activity of Pembrolizumab in Patients with Estrogen Receptor–Positive/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative Advanced Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, clincanres.3452.2017. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3452>
- Safinia, N., Scotta, C., Vaikunthanathan, T., Lechler, R. I., & Lombardi, G. (2015). Regulatory T cells: Serious contenders in the promise for immunological tolerance in transplantation. *Frontiers in Immunology*, 6(AUG), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00438>
- Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J. M., Blazar, B. R., Kuchroo, V. K., & Anderson, A. C. (2010). Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(10), 2187–2194. <https://doi.org/10.1084/jem.20100643>
- Schneble, E. J., Berry, J. S., Trappey, F. A., Clifton, G. T., Ponniah, S., Mittendorf, E., & Peoples, G. E. (2014). The HER2 peptide nelipepimut-S (E75) vaccine (NeuVax™) in breast cancer patients at risk for recurrence: Correlation of immunologic data with clinical response. *Immunotherapy*, 6(5), 519–531. <https://doi.org/10.2217/imt.14.22>
- Scully, O. J., Bay, B.-H., Yip, G., & Yu, Y. (2012). Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics & Proteomics*, 9(5), 311–20. <https://doi.org/9/5/311> [pii]
- Sergey V. Kozin, Walid S. Kamoun, Yuhui Huang, Michelle R. Dawson, Rakesh K. Jain, and D. G. D. (2010). Recruitment of myeloid but not endothelial precursor cells facilitates tumor re-growth after local irradiation. *Cancer Res*, 70(14), 5679–5685. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4446>.Recruitment
- Sharma, B., Preet Kaur, R., Raut, S., & Munshi, A. (2018). BRCA1 mutation spectrum, functions, and therapeutic strategies: The story so far. *Current Problems in Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.currproblcancer.2018.01.001>
- Sharpe, A. H., Wherry, E. J., Ahmed, R., & Freeman, G. J. (2007). The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature Immunology*, 8(3), 239–245. <https://doi.org/10.1038/ni1443>
- Shimomura, A., Fujiwara, Y., Kondo, S., Kodaira, M., Iwasa, S., Kitano, S., ... Yamamoto, N. (2016). Tremelimumab-associated tumor regression following after initial progression: Two case reports. *Immunotherapy*, 8(1), 9–15. <https://doi.org/10.2217/imt.15.89>
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T,

- Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, N. L. (2001). Numb Er 11 Use of Chemotherapy Plus a Monoclonal Antibody Against Her2. *English Journal*, 344(11), 783–792. <https://doi.org/10.1056/NEJM200103153441101>
- Smyth, M. J., Godfrey, D. I., & Trapani, J. A. (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature Immunology*, 2(4), 293–299. <https://doi.org/10.1038/86297>
- Soroush, A., Farshchian, N., Komasi, S., Izadi, N., Amirifard, N., & Shahmohammadi, A. (2016). The Role of Oral Contraceptive Pills on Increased Risk of Breast Cancer in Iranian Populations: A Meta-analysis. *Journal of Cancer Prevention*, 21(4), 294–301. <https://doi.org/10.15430/JCP.2016.21.4.294>
- Stanton, S. E., & Disis, M. L. (2016). Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 4(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0165-6>
- Steeg, P. S. (2006). Tumor metastasis: Mechanistic insights and clinical challenges. *Nature Medicine*, 12(8), 895–904. <https://doi.org/10.1038/nm1469>
- Steinman, R. M., & Banchereau, J. (2007). Taking dendritic cells into medicine. *The Rockefeller University, USA*, 449(7161), 419–426. <https://doi.org/10.1038/nature06175>
- Subbarao, K., Murphy, B. R., & Fauci, A. S. (2006). Development of effective vaccines against pandemic influenza. *Immunity*, 24(1), 5–9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.12.005>
- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., ... Zhu, H. P. (2017). Risk factors and preventions of breast cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 13(11), 1387–1397. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>
- Tao, J. J., Visvanathan, K., & Wolff, A. C. (2016). Long term side effects of adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *Breast*, 24(2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2015.07.035>
- Teng, M. W. L., Galon, J., Fridman, W. H., & Smyth, M. J. (2015). From mice to humans: Developments in cancer immunoediting. *Journal of Clinical Investigation*, 125(9), 3338–3346. <https://doi.org/10.1172/JCI80004>
- Trédan, O., Lacroix-Triki, M., Guiu, S., Mouret-Reynier, M.-A., Barrière, J., Bidard, F.-C., ... Barthélémy, P. (2015). Angiogenesis and tumor microenvironment: bevacizumab in the breast cancer model. *Targeted Oncology*, 10(2), 189–198. <https://doi.org/10.1007/s11523-014-0334-9>

- Tsavaris, N., Kosmas, C., Vadiaka, M., Kanelopoulos, P., & Boulamatsis, D. (2002). Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes. *British Journal of Cancer*, 87(1), 21–27. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600347>
- van Uden, D. J. P., van Laarhoven, H. W. M., Westenberg, A. H., de Wilt, J. H. W., & Blanken-Peeters, C. F. J. M. (2015). Inflammatory breast cancer: An overview. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 93(2), 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2014.09.003>
- Varga, J. M. (1977). Innate immunity. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 50(1), 85–86. <https://doi.org/10.1056/NEJM200008033430506>
- Verma, S., Miles, D., Gianni, L., Krop, I., Welslau, M., Baselga, J., ... Blackwell, K. (2012). Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 367(19), 1783–1791. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal209124.Trastuzumab>
- Vieira, D. S. C., Dufloth, R. M., Schmitt, F. C. L., & Zeferino, L. C. (2008). Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 30(1), 42–47. <https://doi.org/10.1590/S0100-72032008000100008>
- Vigieron, N. (2015). Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/948501>
- Vu, T., & Claret, F. X. (2012). Trastuzumab: Updated Mechanisms of Action and Resistance in Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, 2(June), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00062>
- Weigelt, B., Peterse, J. L., & Van't Veer, L. J. (2005). Breast cancer metastasis: Markers and models. *Nature Reviews Cancer*, 5(8), 591–602. <https://doi.org/10.1038/nrc1670>
- Wendt, M. K., Taylor, M. A., Schiemann, B. J., & Schiemann, W. P. (2011). Down-regulation of epithelial cadherin is required to initiate metastatic outgrowth of breast cancer. *Molecular Biology of the Cell*, 22(14), 2423–2435. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-04-0306>
- White, J. (2013). Do We Need to Irradiate All Small Invasive Breast Cancers and DCIS? *American Society of Clinical Oncology Educational Book / ASCO. American Society of Clinical Oncology. Meeting*, 2013, 40–4. https://doi.org/10.1200/EdBook_AM.2013.33.40
- Woo, S., Turnis, M. E., Goldberg, M. V, Bankoti, J., Nirschl, C. J., Bettini, M. L., ...

- Alan, J. (2013). Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res*, 72(4), 917–927. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1620>
- World Health Organization Expert Committee 2002. (2003). The Selection and Use of essential medicines. *World Health Organization*, 2003(9). Retrieved from http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42620/1/WHO_TRS_914_eng.pdf
- Wu, X., Peng, M., Huang, B., Zhang, H., Wang, H., Huang, B., ... Zhang, R. (2013). Immune microenvironment profiles of tumor immune equilibrium and immune escape states of mouse sarcoma. *Cancer Letters*, 340(1), 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.07.038>
- Yan, J., Pankhong, P., Shin, T. H., Obeng-Adjei, N., Morrow, M. P., Walters, J. N., ... Weiner, D. B. (2013). Highly optimized DNA vaccine targeting human telomerase reverse transcriptase stimulates potent antitumor immunity. *Cancer Immunology Research*, 1(3), 179–89. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0001>
- Yilmaz, M., & Christofori, G. (2010). Mechanisms of Motility in Metastasizing Cells. *Molecular Cancer Research*, 8(5), 629–642. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0139>
- Yip, C.-H., & Rhodes, A. (2014). Estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Future Oncology*, 10(14), 2293–2301. <https://doi.org/10.2217/fon.14.110>
- Yoshinaka, R., Shibata, M.-A., Morimoto, J., Tanigawa, N., & Otsuki, Y. (2006). COX-2 inhibitor celecoxib suppresses tumor growth and lung metastasis of a murine mammary cancer. *Anticancer Research*, 26(6B), 4245–4254. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17201140>
- Yu, H., Yang, J., Jiao, S., Li, Y., Zhang, W., & Wang, J. (2015). Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 expression in human breast cancer: implications for prognosis. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64(7), 853–860. <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1696-2>
- Yu, P., & Fu, Y. X. (2006). Tumor-infiltrating T lymphocytes: Friends or foes? *Laboratory Investigation*, 86(3), 231–245. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700389>
- Zhang, Z., Wang, J., Tacha, D. E., Li, P., Bremer, R. E., Chen, H., ... Tang, P. (2014). Folate Receptor α Associated With Triple-Negative Breast Cancer and Poor Prognosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 138(7), 890–895. <https://doi.org/10.5858/arpa.2013-0309-OA>

Zhu, X., & Verma, S. (2015). Targeted therapy in her2-positive metastatic breast cancer: a review of the literature. *Current Oncology (Toronto, Ont.)*, 22(Suppl 1), S19-28.
<https://doi.org/10.3747/co.22.2363>

Anexos

Anexo I- Fases dos fármacos em estudo na imunoterapia (Moreno Ayala, Gottardo, Asad, et al., 2017)

IMMUNOTHERAPY	APPROACH	ACTION	PHASE	REFERENCE
IMMUNOLOGICAL CHECKPOINT BLOCKADE	Nivolumab+Ipilimumab+Entinostat (histone deacetylase inhibitor)	PD-1 and CTLA-4 inhibition+ antineoplastic drug	I	NCT02453620
	Nivolumab+Ipilimumab+ cryoablation	PD-1 and CTLA-4 inhibition+ cryoablation	Pilot	NCT02833233
	Tremelimumab	CTLA-4 inhibition	I	NCT02527434
	Durvalumab + Tremelimumab	CTLA-4 receptor and PD-1 ligand inhibition	I II	NCT01975831 NCT02527434
	Durvalumab + Radiotherapy	PD-1 ligand inhibition+ cytotoxicity	I	NCT02839026
	Pembrolizumab	PD-1 receptor inhibition	I III	NCT01848834 NCT02555657
	Pembrolizumab+Epacadostat	PD-1 ligand inhibition+ IDO inhibition	I	NCT02178722
	Atezolizumab+Nab-paclitaxel	PD-L1 ligand inhibition+cytotoxicity	II	NCT02530489
	Atezolizumab + CPI-444	PD-L1 blockade+inhibition of adenosine-mediated immunosuppression	I	NCT02855822
	Avelumab	PD-L1 blockade	I	NCT01772004
TSR-022+PD-1 blockade	TIM-3+PD-1 blockade	I	NCT02817833	

	IMP321+Paclitaxel	soluble LAG-3+ chemotherapy	I II	NCT03496934 NCT02814633
	MEDI6469+Radiation	OX-40 stimulation+ cytotoxicity	III	NCT01842290
	MOXR0016+atezolizumab+ bevacizumab	OX-40 stimulation+PD-L1 blockade+VEGF neutralization		NCT02410512
THERAPEUTIC VACCINES	Folate Receptor Alpha (FR α) peptides + GM-CSF	Cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response and macrophages activation	II	NCT02583227
	MAG-Tn3	Tn carbohydrate antigen recognition	I	NCT02384492
	OBI-833	CTL response against Globo H-expressing tumor cells	I	NCT02310494
	GP2+GM-CSF vs AE37+GM-CSF	CTL response against HER2-expressing tumor cells	II	NCT00524277
	NeuVax+GM-CSF	CTL response against HER2-expressing tumor cells	III	NCT01479244
	MVF-HER2 peptides	B and T cell response against HER2-expressing tumor cells	I	NCT01376505
	INO-1400 + INO-9012	TERT inhibition+IL-12	I	NCT02327468
	Personalized polypeptide DNA	CTL response against autologous tumor antigens	I	NCT02348320
	PANVAC	CTL response against tumor cells expressing MUC-1 and CEA	II	NCT00179309

ADOPTIVE T CELL THERAPY	HER-loaded DC vaccine	Immune response against HER2-expressing tumor cells	I	NCT02063724
	Trastuzumab+NeuVax+GM-CSF	Cytotoxicity in HER2-expressing tumor cells	II	NCT01570036; NCT02297698
	Chimeric T cell receptors (CAR)	c-Met inhibition	I	NCT01837602
	Immune cells engineered	Overexpressed mesothelin protein recognition	I	NCT02414269
	T cells engineered	NY-ESO-1, MAGE-A4, PRAME, survivin, and SSX markers recognition	I	NCT02239801