



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**A IMUNOTERAPIA NO TRATAMENTO DO CANCRO**

Trabalho submetido por  
**Ana Teresa Cunha Batista**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**setembro de 2016**



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**A IMUNOTERAPIA NO TRATAMENTO DO CANCRO**

Trabalho submetido por  
**Ana Teresa Cunha Batista**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutora Ana Clara Ribeiro**

**setembro de 2016**



## *Agradecimentos*

Ao longo destes cinco anos muitas foram as pessoas que me acompanharam e que de algum modo, tornaram possível a finalização do meu Mestrado.

À minha orientadora, Prof. Doutora Ana Clara Ribeiro, agradeço por todo o apoio e ajuda incansáveis, pelos sábios conselhos e críticas que fundamentaram e ajudaram a construir este trabalho.

Ao meu avô, pelo grande exemplo que é, e por tudo o que fez por mim até hoje. Que o nosso tempo juntos perdure por muitos e bons anos.

Ao meu irmão, pai, mãe e amigos agradeço por sempre acreditaram em mim e por nunca me deixarem desistir.

Por último, às minhas grandes amigas Marta Figueiredo e Elisa Pacheco, por serem quem são, por todos os momentos e por toda a ajuda e apoio incansáveis. Sem eles a realização deste trabalho não teria sido o mesmo.

A todos, Muito Obrigada!



## ***Resumo***

O sistema imunológico é extremamente importante na manutenção da homeostasia de qualquer organismo. No entanto, certas doenças conseguem estabelecer-se comprometendo assim, por vezes, a sua sobrevivência.

No cancro, as células imunitárias podem promover a eliminação das células malignas ou até mesmo contribuir para o desenvolvimento tumoral. De facto, são inúmeros os fatores que contribuem para o desenvolvimento de um tumor. Entre eles constam a inflamação, as células do sistema imunitário, fatores genéticos, a exposição a compostos carcinogénicos, entre muitos outros, sendo por isso extremamente importante estudar e compreender cada um deles, de forma a direcionar e otimizar os tratamentos existentes.

Desenvolve-se então um método de tratamento, a imunoterapia, que utiliza o sistema imunológico do hospedeiro no combate ao cancro. Dentro da imunoterapia, existem várias vertentes, nomeadamente os inibidores do *checkpoint*, as vacinas e a transferência celular adotiva (ACT), apresentando qualquer uma delas um enorme potencial. Atualmente, já são várias as combinações e variantes terapêuticas exploradas que ajudam a potenciar este tipo de tratamento oncológico. É o caso da ACT que promove a libertação local de agentes terapêuticos e a manipulação do microbioma,

A Sequenciação de Última Geração (NGS) é uma ferramenta bastante útil que, permitiu não só aumentar os conhecimentos sobre o genoma das células tumorais e sobre os mecanismos intracelulares envolvidos na progressão tumoral, mas também, desenvolver novos alvos (neo-antígenos) e terapêuticas para o tratamento do cancro.

No entanto, apesar do longo caminho já percorrido, ainda há muito a fazer e a alcançar. Contudo, as novas moléculas em desenvolvimento, e a combinação de terapêuticas irão culminar, certamente, numa Nova Era no tratamento do cancro.

**Palavras-chave:** Sistema Imunitário; Cancro; Imunoterapia; Sequenciação de última Geração

## *Abstract*

The immune system is extremely important to the maintenance of the organism homeostasis. However, sometimes certain diseases can establish and therefore compromise its survival.

The competitive interaction between the immune system and cancer cells can promote the eradication of the malignant cells or, otherwise, contribute to the tumor development. Indeed, several factors can contribute to the tumor development such as inflammation, the immune cells, genetic factors, exposure to carcinogenic compounds, among other factors. Accordingly, the study and understanding of each one of these factors is essential to direct and optimize the current therapies.

To avoid this issue, a new kind of therapy denominated immunotherapy emerged which takes advantage of the host immune system to better fight cancer. The checkpoint inhibitors, cancer vaccines and Adoptive Cell Transfer (ACT) of immunotherapy, as well as many others, have huge potential in cancer fighting. Currently, there are already being exploited several combinations and variants of this kind of therapy capable of improve the cancer treatment. This is the case of ACT that promotes the local release of therapeutic agents and microbiome manipulation.

Furthermore, through Next Generation Sequencing (NGS) it was possible to improve the knowledge of the tumor cells genome and intracellular mechanisms involved in tumor progression, as well as the development of new targets (neo-antigen) and new therapies for the cancer treatment.

However, besides all the improvements regarding cancer research, there is still much to do and achieve in this field. Nevertheless, the emerging molecules in development and the combination of therapies are certainly a step forward to a new age in cancer treatment.

**Keywords:** Immune System; Cancer; Immunotherapy; Next Generation Sequencing

## *Índice Geral*

Índice de Figuras .....	5
Lista de Abreviaturas.....	6
Capítulo I- Introdução .....	9
Capítulo II- Portugal e o Cancro .....	10
Capítulo III- Sistema Imunitário Versus Células Malignas.....	14
1- O Papel da Inflamação.....	14
1.1- Iniciação tumoral .....	18
1.2- Promoção tumoral.....	19
1.3- Angiogénese.....	20
1.5- Progressão .....	21
2- Constituição do Sistema Imunitário .....	23
2.1-A imunidade na Prevenção .....	26
2.2- Antigénios Tumoriais.....	27
2.3- A Regressão Espontânea dos Tumores versus fuga ao Sistema Imunitário ....	28
Capítulo IV- Terapêuticas Aplicadas ao Cancro .....	31
1- Terapêuticas Atuais e a Inflamação.....	31
2- O Papel da Sequenciação de Última Geração na Imunoterapia .....	33
3- Áreas Terapêuticas Ligadas ao Sistema Imunológico.....	35
3.1- O <i>Checkpoint</i> imunológico .....	35
3.1.1- Evidências Científicas.....	38
3.1.2- Efeitos Adversos.....	39
3.1.3- O Futuro.....	39
3.1.4- O Microbioma.....	41
3.1.5- A Indolamina-2,3-dioxigenase .....	41
3.1.6-Atezolizumab e Ventana PD-L1 .....	42
3.2- Vacinas.....	43
3.2.1- Evidências Científicas.....	44
3.2.2-Efeitos Adversos e Limitações .....	45
3.3- Transferência Celular Adotiva.....	45
3.3.1- Células T.....	46
3.3.2- Linfócitos Infiltrantes de Tumor (TILs).....	47

3.3.3- Vantagens .....	48
3.3.4- Evidências Científicas.....	48
3.3.5- Transferência celular Adotiva - Novas Vertentes .....	49
3.3.6- Limitações .....	51
Capítulo V- Conclusão .....	52
Capítulo VI- Bibliografia .....	54
Anexos	

## *Índice de Figuras*

<b>Figura 1:</b> Taxa de Mortalidade associada a Doenças do Sistema Circulatório, do Aparelho Respiratório, Cerebrovasculares e a Tumores Malignos (adaptado de DGS, 2015).....	10
<b>Figura 2:</b> Doenças com maior Impacto sobre a População Portuguesa, em termos de Morbilidade, Incapacidade e Morte Prematura (adaptado de DGS, 2015). .....	11
<b>Figura 3:</b> Dispensa de Medicamentos utilizados no tratamento de Neoplasias nos Hospitais do SNS (Sistema Nacional de Saúde) (DGS, 2014, 2016).....	13
<b>Figura 4:</b> Indução da apoptose da célula maligna através da ação enzimática da perforina, granzima B e do FasL sintetizadas pela célula imune (adaptado de Messerschmidt et al., 2016).....	26
<b>Figura 5:</b> <i>Immunoediting</i> . .....	30
<b>Figura 6:</b> Inativação da via supressora das células T, CTLA-4, através do uso de um anticorpo monoclonal anti-CTLA-4 (adaptado de Ilumina, s.d.a). .....	36
<b>Figura 7:</b> Bloqueio da via indutora da apoptose, PD-1, através da utilização de um anticorpo monoclonal anti-PD-1 (adaptado de Ilumina, s.d.a).....	38
<b>Figura 8:</b> Apresentação do neo-antigénio pelas APCs às células T do hospedeiro (adaptado de Messerschmidt et al., 2016). .....	44
<b>Figura 9:</b> Transferência Celular Adotiva de células T (adaptado de Ilumina, s.d.a)....	46

### *Lista de Abreviaturas*

- **ACT-** *Adoptive Cell Transfer*; Transferência Celular Adotiva
- **ADN-** Ácido Desoxirribonucleico
- **AINES-** Anti-Inflamatórios não Esteroides
- **APCs-** *Antigen-presenting Cells*, Células Apresentadoras de Antígenos
- **ARN-** Ácido Ribonucleico
- **ARNm-** Ácido Ribonucleico Mensageiro
- **ARS-** Administração Regional de Saúde
- **ATP-** Adenosina Trifosfato
  
- **Bcl-2-** *B-cell Lymphoma 2*
- **Bcl-XL-** *B-cell Lymphoma-extra Large*
- **BCR-** *Receptors on the Surface of B Cells*, Recetores na Superfície das Células B
- **BHE-** Barreira Hematoencefálica
  
- **CAC-** Colite Associada ao Cancro
- **CAR-** *Chimeric Antigen Receptor*, Recetor de Antígeno Quimérico
- **CCR-** Carcinoma de Células Renais
- **CD4<sup>+</sup>-** *Cluster of Differentiation 4<sup>+</sup>*
- **CD8<sup>+</sup>-** *Cluster of Differentiation 8<sup>+</sup>*
- **CD19-** *Cluster of Differentiation 19*
- **CD28-** *Cluster of Differentiation 28*
- **COX2-** Ciclo-oxigenase-2
- **CPCNP-** Cancro do Pulmão de Células Não-pequenas
- **CTGF-** *Connective Tissue Growth Factor*, Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo
- **CTLA-4-** *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*
- **CTLs-** *Cytotoxic T lymphocytes*, Linfócitos T Citotóxicos
- **CXCL1-** Quimiocina L1
- **CXCL8-** Quimiocina L8
  
- **DEN-** Dietilnitrosamina Cancerígena
- **DGS-** Direção-Geral da Saúde

- **DPOC-** Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica
- **FasL-** *Fas ligand*
- **FDA-** *Food and Drug Administration*
- **GM-CSF-** *Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor*, Fator Estimulante de Colónias de Granulócitos e Macrófagos
- **gp100-** Glicoproteína 100
- **HER2-** *Human Epidermal Growth factor Receptor 2*, Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2
- **HMGB1-** *High-mobility Group box 1 Protein*
- **IDO-** Enzima Indolamina 2,3-dioxigenase
- **IL-1 $\beta$ -** Pro-interleucina-1 $\beta$
- **IL-1-** Interleucina 1
- **IL-2-** Interleucina 2
- **IL-6-** Interleucina 6
- **IL-8-** Interleucina 8
- **IL-11-** Interleucina 11
- **LLC-** Leucemia Linfocítica Crónica
- **LTA-** Linfoxina Alfa
- **MART1-** *Melanoma Antigen Recognized by T-cells 1*, Antígeno do melanoma, reconhecido por células T 1
- **MDSCs-** *Myeloid-derived Suppressor Cells*, Células Supressoras Derivadas da Linhagem Mieloide
- **MHC-** *Major Histocompatibility Complex*, Complexo Principal de Histocompatibilidade
- **NF- $\kappa$ B-** *Nuclear Factor- $\kappa$ B*, Fator Nuclear  $\kappa$ -B
- **NGS-** *Next Generation Sequencing*, Sequenciação de Última Geração
- **NK-** *Natural Killers*

- **OMS-** Organização Mundial de Saúde
- **PAP-** Proteína de Fusão Fosfatase Ácida Prostática
- **PD-1-** Recetor da Morte Celular Programada-1
- **PD-L1-** *Programmed Death-ligand 1*, Ligando-1 do Recetor da Morte Celular Programada
- **ROS-** *Reactive Oxygen Species*, Espécies reativas de Oxigénio
- **SNS-** Sistema Nacional de Saúde
- **TAMs-** *Tumor-associated Macrophages*, Macrófagos Associados a Tumor
- **TCR-** *T-cell Receptor*, Recetor das Células T
- **TGF- $\beta$ -** *Transforming growth factor-beta*, Fator de Transformação do Crescimento- beta
- **TGI-** Trato Gastrointestinal
- **Th-** *T Helper Cells*, Linfócito T Auxiliar
- **Th17-** Linfócito T Auxiliar 17
- **TILs-** *Tumor-infiltrating Lymphocytes*, Linfócitos Infiltrantes de Tumor
- **TLR2-** *Toll-like receptor 2*
- **TLR4-** *Toll-like receptor 4*
- **TNF- $\alpha$ -** *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* , Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$
- **Treg-** *Regulatory T Cell*; Linfócito T regulador
- **VEGF-** *Vascular Endothelial Growth Factor*, Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
- **VHB-** Vírus da Hepatite B
- **VHC-** Vírus da Hepatite C
- **VIH-** Vírus da Imunodeficiência Humana
- **VPH-** Vírus do Papiloma Humano

## Capítulo I- Introdução

O sistema imunológico é extremamente importante para a sobrevivência dos seres vivos. Desregulações neste podem acarretar consequências muito graves, como é o caso das doenças autoimunes e do cancro (Caspi, 2008).

Alterações ao nível do genoma das células que compõem um organismo estão constantemente a ocorrer, porém, a grande maioria destas não se consegue estabelecer, isto porque existem mecanismos que ou as reparam, ou promovem a eliminação da célula portadora da mutação. Contudo, por vezes estes mecanismos falham, ou como é no caso das células cancerígenas, estas alterações conferem às células malignas a capacidade de “escapar” à ação do sistema imunitário (Kim, Emi & Tanabe, 2007; Torgovnick & Schumacher, 2015).

Cada vez mais, devido ao aumento da esperança média de vida, a prevalência e a incidência do cancro tem vindo a aumentar, assim como, as necessidades da população em obter um tratamento eficaz, seguro e que permita a manutenção de uma vida com qualidade (Direção-Geral da Saúde, 2015).

Apesar das várias moléculas e terapêuticas que existem para o cancro, nenhuma delas se equipara à imunoterapia (Sharma & Allison, 2015a).

A imunoterapia, sendo o único método de tratamento do cancro que usa o sistema imunitário como arma, consegue assim obter não só especificidade como memória. Para se alcançar o patamar que hoje a terapêutica imunológica ocupa, a sequenciação de última geração (NGS) desempenhou um papel crucial (Sharma & Allison, 2015a).

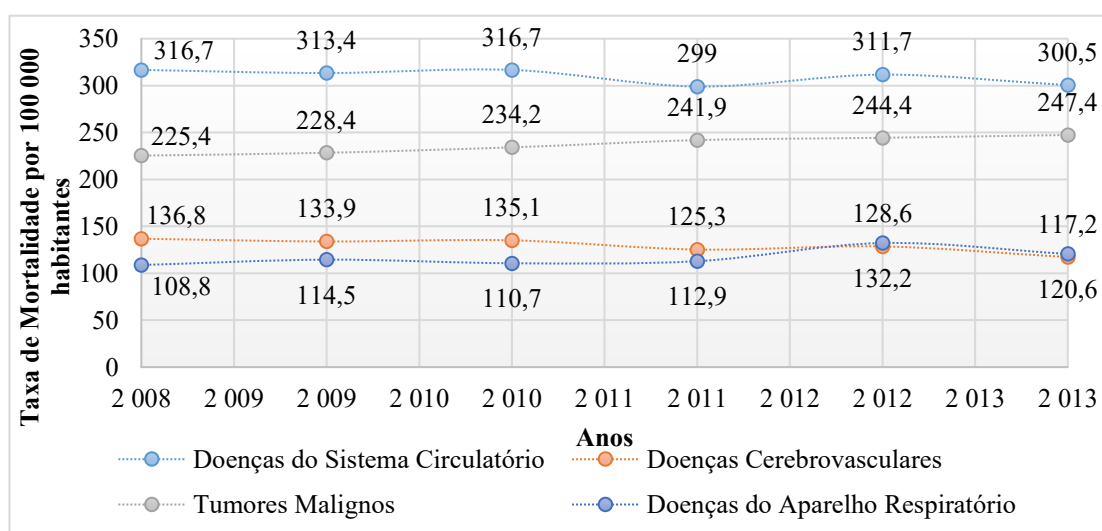
O presente trabalho resulta de uma intensa pesquisa bibliográfica que envolveu a consulta de *sites* como o PubMed, a B-on, o Medscape. Vão ser abordados temas como: o papel da inflamação e do sistema imunitário no desenvolvimento tumoral; quais os progressos que a NGS permitiu alcançar na luta contra o cancro; que terapêuticas existem atualmente na imunoterapia. Para além disso, serão mencionados ainda alguns aspetos, como é caso do microbioma e da IDO (indolamina-2,3-dioxigenase), capazes de afetar essas mesmas terapêuticas devido à sua influência sobre o sistema imunitário.

## Capítulo II- Portugal e o Cancro

O cancro é um enorme flagelo a nível mundial. Para além de ser responsável por uma em cada sete mortes no mundo inteiro, apresenta também uma taxa de mortalidade superior à do VIH (vírus da imunodeficiência humana), da tuberculose e da malária juntos. Estimativas de 2012 apontavam para a existência de 8,2 milhões de mortes devidas ao cancro, e para cerca de 14,1 milhões de pessoas diagnosticadas com esta doença (*American Cancer Society*, 2015).

Ao longo das décadas, muitos têm sido os avanços tecnológicos e científicos que têm contribuído para o aumento da esperança média de vida e para uma melhor qualidade da mesma. Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), Portugal desde 1990 até 2013 passou de uma esperança média de vida de 74 anos para 81 anos após o nascimento, e de 20 para 24 anos após os 60 anos. Em 2015 a maioria da população encontrava-se na faixa etária dos 40-44 anos, e espera-se que em 2035 a maioria da população esteja concentrada na faixa etária dos 55-64 anos (Direção-Geral da Saúde, 2015, 2016; *World Health Organization*, 2015).

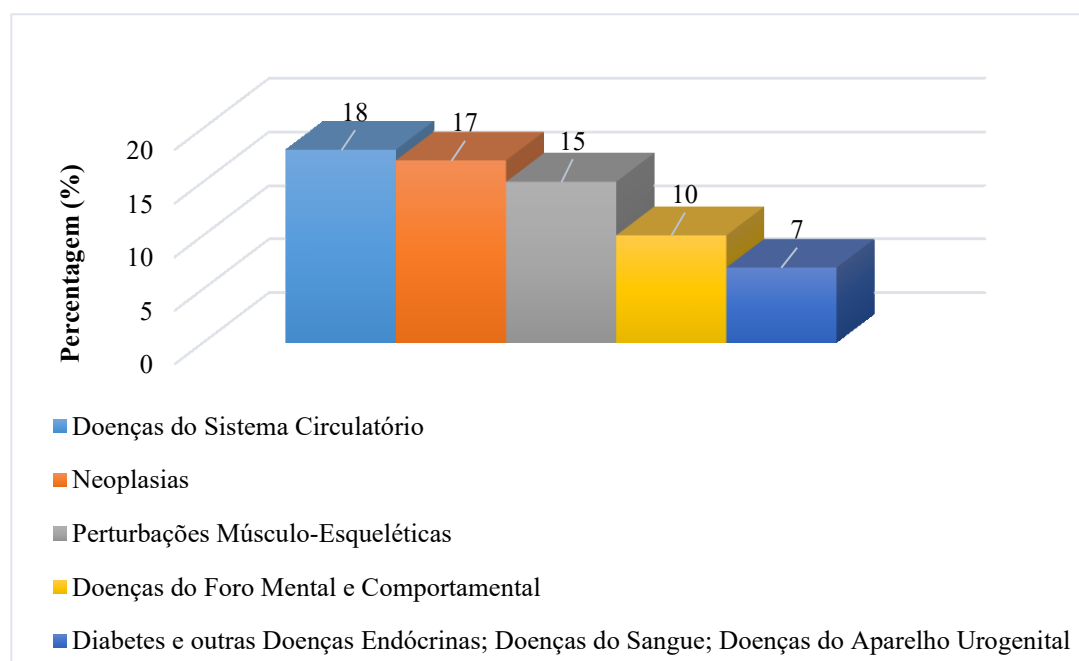
Com o aumento da esperança média de vida, também se verificou o aumento da prevalência de determinadas doenças na população. Enquanto em algumas delas, a taxa de mortalidade apresenta uma redução (Doenças do Sistema Circulatório, Doenças Cerebrovasculares), noutras, tal não se verifica (Tumores Malignos, Doenças do Aparelho Respiratório) como se observa na figura 1 (DGS, 2015).



**Figura 1:** Taxa de Mortalidade associada a Doenças do Sistema Circulatório, do Aparelho Respiratório, Cerebrovasculares e a Tumores Malignos (adaptado de DGS, 2015).

Em Portugal, as doenças crónicas são responsáveis por 85% da morbilidade, seguindo-se lesões (9%) e outras situações patológicas, como são exemplo as infeções do trato respiratório superior e o VIH (6%) (DGS, 2015).

As neoplasias são um dos grupos de doenças que mais contribuem para a morbilidade, incapacidade e morte prematura, tendo uma grande influência, por isso, na saúde e qualidade de vida da população portuguesa (17%), como se verifica na figura 2. No entanto, se apenas se considerar a morbilidade, o impacto na saúde dos cidadãos é de apenas 1,36%. Verificou-se ainda que, em 2013, os tumores malignos foram responsáveis por 24% da mortalidade geral e por 41% da mortalidade prematura (antes dos 70 anos de vida) (DGS, 2015).



**Figura 2:** Doenças com maior Impacto sobre a População Portuguesa, em termos de Morbilidade, Incapacidade e Morte Prematura (adaptado de DGS, 2015).

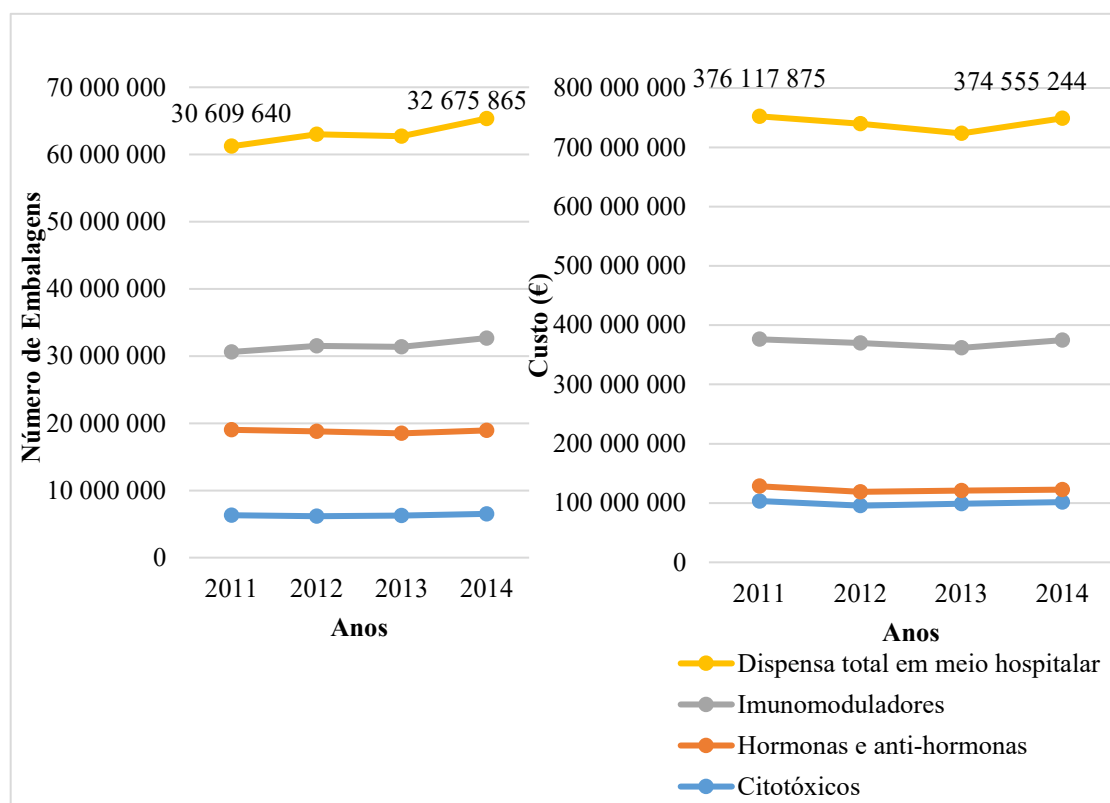
Segundo a Direção Geral de Saúde (DGS), em 2010, os quatro tumores com maior incidência em Portugal foram o cancro da próstata, seguido do cancro da mama, do cancro cólon e do cancro da traqueia, brônquios e pulmão. Na mulher, os quatro principais tumores malignos foram o cancro da mama, seguido do cancro no cólon, da glândula tireoideia e do estômago. Já no homem, o cancro da próstata foi o que apresentou uma maior taxa de incidência, seguindo-se o cancro ao nível da traqueia, brônquios e pulmão, cancro do cólon e cancro do estômago (DGS, 2016).

O cancro da mama tem ao longo dos anos apresentado uma taxa de mortalidade essencialmente crescente (2008- taxa de mortalidade de 28,8%; 2012- taxa de mortalidade de 31,9%). Em 2013 o panorama parecia ter melhorado, com um decréscimo de 2% na taxa de mortalidade face ao ano anterior (taxa de mortalidade de 29,9%). Mas na verdade, em 2014 os valores voltaram a aumentar (taxa de mortalidade de 30,4%), tendo a Administração Regional de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo (ARS Lisboa e Vale do Tejo) apresentado os valores mais elevados de óbitos (525 óbitos) (Direção Geral de Saúde, 2014, 2016).

Prevê-se que a incidência do cancro em Portugal continue a crescer, chegando mesmo a ultrapassar em 2030 os 60 000 habitantes (em 2015 estima-se que esta rondou os 50 000 habitantes) (DGS, 2016).

Com o objetivo de tentar diminuir a taxa de mortalidade provocada pelo cancro, torna-se imprescindível adotar hábitos de vida saudáveis, como não fumar, não ingerir bebidas alcoólicas (ambos iniciadores de neoplasias). Por outro lado, é ainda importante promover, junto da população, hábitos de rastreio, de monitorização e de vigilância. Devido à evolução demográfica e à crescente exposição da população a fatores de risco, a incidência do cancro tende a ser cada vez mais elevada, como observado através das projeções nacionais (DGS, 2014, 2015).

Em relação ao consumo (em quantidades) e aos gastos por parte dos hospitais relativamente a hormonas e anti hormonas, estes têm vindo a decrescer. Porém, o mesmo já não se verifica em relação aos imunomoduladores e aos citotóxicos, que aumentaram. Pode-se então assim concluir que de 2011 a 2014 houve um aumento na quantidade de antineoplásicos utilizados nos hospitais, apresentando o ano de 2014 o valor mais elevado. Já em relação aos custos que o uso deste tipo de medicamentos acarreta para os hospitais, o valor decresceu entre 2011 e 2014 (376 117 875 €; 374 555 244 €, respetivamente) (figura 3) (DGS, 2014, 2016).



**Figura 3:** Dispensa de Medicamentos utilizados no tratamento de Neoplasias nos Hospitais do SNS (Sistema Nacional de Saúde) (DGS, 2014, 2016). -Os dados de 2014 são preliminares.

### ***Capítulo III- Sistema Imunitário Versus Células Malignas***

#### **1- O Papel da Inflamação**

A inflamação consiste numa resposta fisiológica do organismo a um determinado estímulo, sendo vários os mediadores e as moléculas que intervêm ao longo de todo o processo. Ao longo do tempo, tem-se verificado que as respostas inflamatórias desempenham um papel muito importante nas diferentes fases do desenvolvimento tumoral. Estas acabam mesmo por influenciar a resposta imunológica e também a própria resposta à terapêutica, podendo tanto beneficiá-la como prejudicá-la (Grivennikov, Greten & Karin, 2010).

Foi no século XIX que Rudolf Virchow observou pela primeira vez a presença de células do sistema imunitário no interior de tumores. Já nesta altura, começavam-se a dar os primeiros passos numa teoria que relacionava a inflamação com o desenvolvimento tumoral. Apesar dos inúmeros avanços neste campo, a verdade é que apenas na última década é que se conseguiram alcançar evidências sobre o papel desempenhado pela inflamação no cancro e que se entenderam alguns dos mecanismos moleculares inerentes a essa mesma resposta. Atualmente, já se sabe que a inflamação apresenta um papel muito importante na tumorigénese, tendo-se igualmente verificado que o microambiente inflamatório que se gera em torno das células malignas é extremamente importante e essencial para o desenvolvimento de qualquer tumor (Aggarwal, Vijayalekshmi & Sung, 2009; Martin-Orozco et al., 2009; Grivennikov et al., 2010).

Existem inúmeros fatores que podem levar ao aparecimento do cancro. De todos eles, a herança genética (de genes alterados) e as mutações somáticas que ocorrem durante a replicação do ácido desoxirribonucleico (ADN) representam apenas cerca de 5 a 10 % de todos os cancros. Já o ambiente e o estilo de vida representam aproximadamente 90 a 95 % dos cancros (Aggarwal et al., 2009).

De facto, a grande maioria dos fatores de risco estão associados a inflamações crónicas. Efetivamente, cerca de 18% dos cancros estão associados a infeções crónicas, 30% devem-se ao fumo do tabaco, 7% aos poluentes inalados como a sílica e asbestos, e à radiação (fatores ambientais), 35% à alimentação e 20% dos cancros estão associados à obesidade (Aggarwal et al., 2009).

A exposição e inalação de compostos como o amianto e a sílica, que por si só não apresentam atividade mutagénica evidente, pode com o tempo levar ao desenvolvimento

de fibrose pulmonar e mais tarde levar ao aparecimento de cancro do pulmão. Estas moléculas conseguem assim originar um processo inflamatório, que consequentemente pode promover o aparecimento de células malignas, através da sua ação sobre o inflamassoma e subsequente aumento dos níveis da pro-interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Dostert et al., 2008).

Em relação ao fumo do tabaco, um trabalho recente de Takahashi, Ogata, Nishigaki, Broide & Karin (2010), demonstrou que para além de este ser um potente iniciador tumoral, devido ao seu elevado teor em alcatrão e outros agentes carcinogénicos, este tem também a capacidade de funcionar como iniciador, através da inflamação crónica que a sua exposição prolongada e repetitiva provoca. Efetivamente, o fumo do tabaco e outros compostos com o tempo, podem originar DPOC (doença pulmonar obstrutiva crónica), condição esta relacionada com uma maior probabilidade de se desenvolver cancro do pulmão (Punturieri, Szabo, Croxton, Shapiro & Dubinett, 2009; Takahashi, Ogata, Nishigaki, Broide & Karin, 2010).

Da mesma forma, a obesidade, cuja prevalência está a aumentar a um nível alarmante, promove a tumorigénese do fígado e do pâncreas (o risco de cancro > 1,6 vezes) (Grivennikov et al., 2010).

A maioria dos tumores sólidos surge em indivíduos idosos, uma vez que com o passar do tempo a acumulação de ADN modificado associado à senescência celular, funcionam como iniciadores tumorais que atuam através de mecanismos inflamatórios (Grivennikov et al., 2010).

No caso das infeções crónicas, como é o caso das infeções por *Helicobacter pylori*, *Bacteroides*, pelo vírus da hepatite B (VHB) ou C (VHC), estas aumentam e muito o risco de o portador vir a desenvolver carcinoma gástrico, na bexiga e no cólon, ou no fígado, respetivamente. Isto porque na tentativa de eliminar o agente patogénico, o sistema imunitário reage, desencadeando todo um processo inflamatório, que com o tempo acaba por levar ao desenvolvimento tumoral. Assim, este tipo de agentes patogénicos por conseguirem perturbar a reposta imunitária do hospedeiro e deste modo, estabelecer infeções persistentes associadas a inflamações crónicas, são considerados agentes tumorigénicos (Wu et al., 2009).

Grivennikov, Greten & Karin (2011) citaram que Coley verificou, ainda na década de 1890, através de determinadas preparações microbianas, que agentes patogénicos capazes de induzir inflamações agudas eram capazes de tratar o cancro. Apesar de ainda não se compreender muito bem o que torna a inflamação aguda eficaz no tratamento do

cancro da bexiga, atualmente, uma dessas preparações microbianas é utilizada no seu tratamento (Grivennikov et al., 2010).

A própria desregulação imune e autoimune, através da inflamação crónica, pode funcionar como um iniciador tumoral. Exemplo disso é a doença inflamatória do intestino que aumenta em muito a probabilidade de se vir a desenvolver cancro colo-retal (Waldner & Neurath, 2009).

No entanto, há também que ter em conta, que nem todas as doenças inflamatórias crónicas estão relacionadas com o aumento de risco de cancro. A psoríase, por exemplo, consiste numa doença inflamatória crónica da pele, que nunca ou raramente foi associada ao cancro (Nickoloff, Ben-Neriah & Pikarsky, 2005).

Ainda não são claros quais os fatores que influenciam o aparecimento das doenças oncológicas em determinadas inflamações crónicas, como acima referido, porém, uma possibilidade pode estar relacionada com a maior predisposição que certas porções do organismo têm em estar em contacto com possíveis agentes carcinogénicos, como é o caso do trato gastrointestinal (TGI) e do fígado (Grivennikov et al., 2010).

Como já foi descrito anteriormente, a existência de um processo inflamatório não obriga necessariamente à existência de um tumor. No entanto, quando a inflamação se torna crónica, a probabilidade de esta potenciar a formação de um tumor aumenta. Existem contudo algumas células malignas que através das alterações genómicas que adquirem, conseguem induzir a formação de um microambiente inflamatório que por si só vai favorecer o desenvolvimento tumoral (Mantovani, Allavena, Sica & Balkwill, 2008).

O *ras* por exemplo, é um oncogene que quando expresso tem a capacidade de modificar o microambiente tumoral. As modificações por ele induzidas são à custa do recrutamento de células do sistema imunitário (leucócitos e linfócitos), da expressão de moléculas como quimiocinas e citocinas, que funcionam como promotores tumorais, e da indução de fatores que vão promover a angiogénese (Sparmann & Bar-Sagi, 2004; Faria & Rabenhorst, 2006).

Todas as células de um organismo necessitam de nutrientes e oxigénio, e as células tumorais não são exceção. A certa altura do desenvolvimento tumoral, a quantidade de nutrientes e oxigénio que as células malignas recebem deixam de ser suficientes. Ao serem privadas das suas necessidades, as células entram em necrose, libertando ao mesmo tempo mediadores pró-inflamatórios como a interleucina 1 (IL-1) e a HMGB1 (*high-mobility group box 1 protein*). Deste modo, toda a resposta inflamatória que se origina

leva à formação de novos vasos sanguíneos (angiogénese), que por sua vez vão garantir assim, a satisfação das necessidades e a sobrevivência das células malignas (Vakkila & Lotze, 2004; Karin, 2006).

No entanto, existem outros casos, como no cancro do pulmão de células não-pequenas (CPCNP), onde através da secreção ativa do versicano (proteoglicano componente da matriz extracelular) é originado o processo inflamatório. No CPCNP o versicano é altamente expresso, e este ao atuar sobre os recetores TLR2 (*toll-like receptor 2*) das células mieloides (macrófagos) promove a síntese de TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral- $\alpha$ ). Este fator, por sua vez, tem a capacidade de inibir a apoptose e de promover a proliferação das células malignas via NF- $\kappa$ B (fator nuclear  $\kappa$ -B). Por outro lado, o TNF- $\alpha$  tem ainda a capacidade de aumentar a permeabilidade vascular, favorecendo a progressão tumoral e o recrutamento de células imunitárias para o local onde o tumor se encontra (Kim et al., 2009).

Independentemente da maneira de como uma célula tumoral se estabelece, é o microambiente do tumor que determina se o tumor se mantém ou não em desenvolvimento. O microambiente tumoral é constituído por fibroblastos, células endoteliais, células mesenquimais entre outras (que constituem o estroma circundante). Deste ambiente, fazem ainda parte células malignas, células imunitárias inatas (macrófagos, neutrófilos, entre outros), células dendríticas, *natural killers* (NK), linfócitos T e B, entre outras células. Estas células através da libertação de citocinas e de quimiocinas, que atuam de forma autócrina e parácrina, comunicam umas com as outras, podendo também participar no desenvolvimento do tumor. No caso de tumores que já se estabeleceram, a inflamação a eles inerente, funciona claramente como um promotor tumoral. Deste modo, se não for realizado algum tipo de intervenção, dificilmente o tumor irá regredir (Smyth, Dunn & Schreiber, 2006; Visser, Eichten & Coussens, 2006; Lin & Karin, 2007; Balkwill, Capasso & Hagemann, 2012).

Através de inúmeras evidências que têm surgido ao longo dos anos, percebe-se que tanto o sistema imunitário, como a inflamação que resultada da sua ação, apresentam um papel ambíguo neste tema tão presente na sociedade atual (Smyth et al., 2006; Visser et al., 2006; Lin & Karin, 2007).

### **1.1- Iniciação tumoral**

Alterações ao nível do ADN ocorrem constantemente. Contudo, para que uma célula maligna se consiga estabelecer, são inúmeros os fatores que têm de ser observados e/ou os mecanismos de regulação que têm de falhar ou ser ineficazes. Na grande maioria dos casos, para que uma célula maligna origine um cancro é necessário que esta seja portadora de pelo menos quatro a cinco mutações. Por outro lado, essas mutações têm de ser obrigatoriamente transmitidas à geração seguinte e daí em diante. Em cancros que apresentam uma rápida renovação celular, como é o caso do cancro do intestino e da pele, caso a célula maligna seja uma célula diferenciada, esta assim como as mutações de que é portadora, não irá conseguir estabelecer-se, logo nunca irá originar um processo cancerígeno. No entanto, se as mutações ocorrerem numa célula estaminal pluripotente ou numa célula amplificadora transitória, a probabilidade de se formar um cancro é bastante elevada. Existem no entanto outros tipos de tumores que partem de células diferenciadas, como é o caso do cancro do fígado. Os hepatócitos, células diferenciadas, apresentam capacidade de proliferação, e um tempo de vida suficientemente longo para não só sofrerem alterações ao nível do ADN, como também para as transmitirem às gerações celulares seguintes (Grivennikov et al., 2010).

Com as descobertas que se têm feito sobre o microambiente inflamatório, tem-se proposto que este pode funcionar como um indutor de mutações, aumentando assim o número de alterações genéticas existentes, e da proliferação das células mutadas (Hussain, Hofseth & Harris, 2003; Meira et al., 2008).

São vários os processos fisiológicos que contribuem para a produção de radicais livres. Efetivamente, tanto o metabolismo aeróbio, como as células inflamatórias favorecem a sua síntese. Os radicais livres, por sua vez, têm a capacidade de interagir com o ADN das células e de induzir alterações. As espécies reativas de oxigénio (ROS) por exemplo, sintetizadas e libertadas por neutrófilos e macrófagos (células inflamatórias) durante um processo inflamatório, têm assim a capacidade de originar instabilidade genómica. Podendo por isso ser um fator importante e favorecedor do cancro. No entanto, ainda não se sabe realmente se estas moléculas apresentem um tempo de semi-vida suficientemente longo que lhes permita alcançar e modificar o ADN das células (Hussain et al., 2003; Meira et al., 2008; Sakurai et al., 2008; Grivennikov et al., 2010).

Para além dos vários fatores associados ao processo inflamatório que induzem e promovem o aparecimento de alterações no genoma, a verdade é que a mutagénesis também pode resultar de uma inativação ou repressão dos genes ou enzimas responsáveis

pela sua reparação. As ROS, por exemplo, conseguem inativar as enzimas responsáveis pela reparação do ADN através da oxidação. A conexão entre a inflamação e a iniciação tumoral é bastante complexa e bidirecional. Isto é, assim como a inflamação pode levar, como já descrito anteriormente, à iniciação tumoral, a verdade é que danos ao nível do ADN também podem desencadear um processo inflamatório e assim promover a formação de um tumor (Hussain et al., 2003; Maeda, Kamata, Luo, Leffert & Karin, 2005; Sakurai et al., 2008; Colotta, Allavena, Sica, Garlanda & Mantovani, 2009; Grivennikov et al., 2010).

No modelo de carcinoma hepatocelular de Maeda, Kamata, Luo, Leffert & Karin (2005), induzido pela dietilnitrosamina cancerígena (DEN), as alterações que ocorreram ao nível do ADN induziram as células a entrar em necrose, originando assim um processo inflamatório que, por sua vez, promoveu o desenvolvimento tumoral (Maeda et al., 2005; Sakurai et al., 2008)

## 1.2- Promoção tumoral

Quando uma célula maligna se estabelece, esta começa a transmitir a sua informação genética à descendência. O processo de crescimento tumoral que ocorre a partir desta célula até se atingir o desenvolvimento primário do tumor é denominado de promoção tumoral. Para que se atinja este desenvolvimento é necessário que a proliferação celular seja superior à morte celular, sendo vários os mecanismos e as moléculas que afetam este desenvolvimento, podendo estas atuar em qualquer altura do processo oncológico (Grivennikov et al., 2010).

O NF- $\kappa$ B, por exemplo, estimula a síntese de proteínas anti-apoptóticas: a Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) e Bcl-XL (*B-cell lymphoma-extra large*). Estas proteínas ao inibirem a apoptose permitem assim, que as células cancerígenas continuem a diferenciar-se. Por outro lado, este fator pode também promover a síntese da IL-2 (interleucina 2) e do GM-CSF (fator estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos), que ao atuarem de forma parácrina e autócrina podem estimular a proliferação das células malignas (Karin, Cao, Greten & Li, 2002; Karin, 2006; Grivennikov et al., 2010).

As citocinas são outro dos grandes exemplos de promotores tumorais. Estas, como é o caso da IL-6 (interleucina 6), do TNF- $\alpha$  e da IL-2 são produzidas por inúmeras células. As citocinas têm a capacidade de induzir inflamação crónica, e de promover o recrutamento celular, nomeadamente de TAMs (macrófagos associados a tumor), MDSCs (células supressoras derivadas da linhagem mieloide), Tregs (linfócitos T

reguladores) e Th17 (linfócito T auxiliar 17) (principais células recrutadas), que por sua vez, quando estimuladas aumentam o número de mediadores inflamatórios (Bonicchi et al., 2008).

Foi através de um estudo realizado por Greten et al. (2004), que se demonstrou geneticamente pela primeira vez o papel que as citocinas, provenientes das células inflamatórias, detinham na promoção tumoral. Neste trabalho, os autores utilizaram um modelo de rato com colite associada ao cancro (CAC), tendo verificado que a inativação do complexo proteico NF- $\kappa$ B em células mielóides, afetou não só o crescimento tumoral (diminuindo-o), como também impediu a síntese de citocinas, como por exemplo a IL-6, em resposta à doença inflamatória (colite) (Greten et al., 2004).

As citocinas atuam essencialmente de forma parácrina, no entanto, as células cancerígenas adquirem a capacidade de sintetizar as suas próprias citocinas, não estando por isso dependentes de outras células (Gao et al., 2007).

### **1.3- Angiogénese**

Com o crescimento tumoral as necessidades nutricionais, de oxigénio e de outros compostos das células malignas também aumentam. No entanto, a partir de uma determinada altura a quantidade de sangue que irriga o tumor deixa de ser capaz de fornecer às células malignas esses mesmos compostos nas quantidades que estas necessitam. Consequentemente, as células acabam assim por entrar em hipoxia. Julga-se que é a partir desta hipoxia, ou dos sinais inflamatórios originados por ela, que ocorre o recrutamento das células imunitárias, que irá por sua vez levar à formação de novos vasos sanguíneos (Kujawski et al., 2008; Rius et al., 2008; Joyce & Pollard, 2009).

Os TAMs, por exemplo, desempenham um papel muito importante na angiogénese tumoral. Estes ao receberem os sinais de hipoxia são recrutados, produzindo quimiocinas e fatores de angiogénese, como a interleucina 8 (IL-8), CXCL1 (quimiocina L1), CXCL8 (quimiocina L8), VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular), que vão permitir às células cancerígenas continuar a proliferar (Kujawski et al., 2008; Rius et al., 2008; Joyce & Pollard, 2009).

O NF- $\kappa$ B também tem a capacidade de induzir a síntese da IL-8 e do VEGF, contribuindo, assim, igualmente na angiogénese (Karin et al., 2002).

### 1.5- Progressão

De todas as fases do cancro, a metastização é o pior cenário possível, apresentando uma taxa de mortalidade superior a 90% (Grivennikov et al., 2010).

A metastização é um processo deveras complexo, constituído por várias etapas que têm de ser ultrapassadas para que uma célula maligna se consiga estabelecer num local diferente do de origem (Kalluri & Weinberg, 2009).

A progressão engloba 4 fases principais. A primeira fase ocorre quando as células cancerígenas adquirem características dos fibroblastos, como por exemplo, maior capacidade de mobilidade e de invasão, e conseguem deslocar-se do seu local de origem, em direção aos vasos sanguíneos e linfáticos. Para que uma célula tumoral se desagregue das restantes, é necessário que ocorram alterações na expressão da caderina-E (proteína de adesão). A caderina-E, ao não ser expressa, ou havendo uma diminuição da sua expressão, permite à célula maligna desagregar-se do tumor e através de integrinas agregar-se à fibronectina (por exemplo) expressa na matriz celular dos tecidos adjacentes. Uma vez ligada a estas, são várias as proteínas proteolíticas segregadas, como é o caso da serina, que promovem a desagregação da matriz, permitindo assim à célula maligna migrar. Tanto as células cancerígenas como as células inflamatórias podem sintetizar, e como tal, funcionar como fonte destas enzimas, demonstrando-se assim, mais uma vez, a importância que a inflamação e o sistema imunitário têm no desenvolvimento tumoral. Na segunda fase, ocorre a passagem das células cancerígenas dos tecidos para o interior dos vasos sanguíneos e/ou linfáticos. Esta passagem pode ser facilitada através da produção de mediadores inflamatórios, que ao aumentarem a permeabilidade vascular facilitam a passagem das células (Joyce & Pollard, 2009; Kalluri & Weinberg, 2009; Zijl, Krupitza & Mikulits, 2011).

Na terceira fase, as células iniciam a circulação ao longo do sistema sanguíneo e/ou linfático. No entanto, menos de 0,01% das células malignas que alcançam o sistema circulatório é que vão efetivamente dar origem a novos tumores. Isto porque, quando uma célula maligna alcança, por exemplo, o sistema sanguíneo, pode facilmente ser detetada e eliminada por células do sistema imunitário (NK). Porém, caso a célula maligna se consiga associar a uma plaqueta ou a um TAM, esta passa a poder circular livremente, uma vez que não é detetável, escapando assim à imuno-vigilância. É na quarta fase que as células tumorais em circulação se ligam novamente ao epitélio (através de integrinas, de enzimas proteolíticas e de outros fatores), onde se irão estabelecer e iniciar todo o processo, que culminará na formação de um novo tumor (Joyce & Pollard, 2009).

São muitos os mediadores e as células que intervêm nestas fases. O TGF- $\beta$  (fator de transformação do crescimento- beta), por exemplo, é responsável por regular várias funções no organismo, tais como a proliferação celular, a diferenciação e a sobrevivência. No caso de um sistema imunitário demasiado ativo, com uma expansão celular muito acentuada, o TGF- $\beta$  desempenha uma ação imunossupressora. No caso das células tumorais o princípio é o mesmo, perante uma proliferação celular acentuada das células malignas, determinados sinais, ainda não estabelecidos, estimulam a síntese deste fator, que ao atuar sobre as células malignas induz a sua apoptose ou inibe a proliferação celular. Por outro lado o TGF- $\beta$  tem ainda a capacidade de atuar sobre o estroma, impedindo que os fibroblastos e as células inflamatórias produzam fatores que iriam de forma parácrina promover a proliferação celular, e como tal o desenvolvimento tumoral (Massagué, 2008; Yang & Weinberg, 2008).

Apesar da ação supressora que o TGF- $\beta$  apresenta sobre as células tumorais, a verdade é que as células cancerígenas, ou pelo menos algumas delas, conseguem utilizar este fator a seu favor. A via do TGF- $\beta$  pode ser comprometida de duas maneiras. Por um lado a célula maligna, devido às mutações que adquire, pode impedir que o TGF- $\beta$  se ligue ao seu recetor, e assim, impedir a ativação da via supressora. Por outro lado, em vez de impedir a ligação ao recetor, a célula maligna pode através da perda dos genes supressores, utilizar o TGF- $\beta$  a seu favor. Assim, o TGF- $\beta$  ao atuar no recetor da célula tumoral, ao invés de induzir a apoptose (ação supressora), irá induzir a transcrição autócrina de fatores que iram promover a sua proliferação. O TGF- $\beta$  está ainda envolvido na metastização, uma vez que promove a transcrição da IL-11 (interleucina 11) e do fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), por exemplo, presentes no cancro da mama e ósseo metastizado (Massagué, 2008).

O TGF- $\beta$  acaba assim por ser um fator que influencia e atua em qualquer fase do desenvolvimento tumoral, apresentando inúmeras funções assim como um papel duplo no cancro (Massagué, 2008; Yang & Weinberg, 2008).

## 2- Constituição do Sistema Imunitário

O sistema imunitário tem a capacidade de proteger o organismo de agentes infecciosos, tais como bactérias, fungos e vírus, e de células originalmente do hospedeiro, que devido a alterações podem comprometer a homeostasia (Segerstrom & Miller, 2004).

Apesar de estarmos rodeados por inúmeros fatores capazes de gerar uma infecção, a verdade é que o sistema imunitário não é constantemente estimulado e não se encontra constantemente ativo. Isto acontece porque, para que um do microrganismo, por exemplo, consiga estabelecer uma infecção, este tem de primeiro conseguir passar por todas as barreiras de defesa do organismo. A primeira barreira de defesa é constituída pela pele e mucosas (barreira física), cujo papel é impedir a entrada de qualquer composto ou microrganismo que possa prejudicar o ser vivo. A segunda barreira é constituída por células do sistema imune inato (macrófagos, células dendríticas, células NK), que fagocitam e eliminam os antígenos que de alguma forma conseguem atravessar a barreira física. Caso o agente patogénico consiga escapar às primeiras linhas de defesa o sistema imune adaptativo, constituído por linfócitos, entra em ação (terceira barreira de defesa) (Messerschmidt, Prendergast & Messerschmidt, 2016).

Uma vez sintetizadas na medula óssea, as células T ainda imaturas migram até ao timo. Aqui, os timócitos (células T imaturas) sofrem um processo de maturação e são selecionados. No processo de maturação ocorrem alterações no *locus* do seu recetor (TCR, recetor das células T), ficando cada célula T com um recetor único (Martin, Coukos, Holt & Nelson, 2015).

Após sofrerem o processo de maturação, as células T são então selecionadas. A seleção positiva ou negativa, tem como base a capacidade e a afinidade com que as células T reconhecem as células do hospedeiro. Para que uma célula seja selecionada positivamente, esta tem de ser capaz de reconhecer os auto-péptidos através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), expressos no epitélio do timo, estabelecendo ligações de baixa afinidade com as auto-proteínas. Se por outro lado, a célula não for capaz de reconhecer o auto-péptido, vendo-o como algo estranho ao organismo, esta ao ligar-se a ele com elevada afinidade é eliminada através da indução da apoptose (seleção negativa). Deste modo, através deste tipo de seleção, consegue-se garantir que apenas entram em circulação as células que conseguem distinguir auto-péptidos de péptidos estranhos, estabelecendo-se interações fortes e de elevada afinidade apenas com os péptidos que não são reconhecidos como sendo do organismo, desencadeando assim uma

potente resposta imune. Estes dois processos juntos dão origem a aproximadamente 250 mil milhões de TCRs diferentes (Palmer & Naehrer, 2009; Moran & Hogquist, 2012; Klein, Kyewski, Allen & Hogquist, 2014; Abbas, Lichtman & Pillai, 2015; Martin et al., 2015; Messerschmidt et al., 2016).

A ativação das células B ocorre através da ligação de uma sequência específica de uma dada proteína (antígeno) ao seu recetor B (BCR, recetores na superfície das células B). Mediante os estímulos estas depois podem tornar-se células produtoras de anticorpos (plasmócitos) ou de memória. Os plasmócitos quando estimulados produzem anticorpos que ao encontrarem a sequência específica que estimulou a sua formação, desencadeiam um conjunto de ações que promovem a eliminação do antígeno. Também nesta fase o sistema inato desempenha um papel muito importante, uma vez que é ele que fagocita o complexo anticorpo-antígeno, levando à sua eliminação. Após a eliminação do antígeno, as células produtoras de anticorpos entram em apoptose, permanecendo apenas as células de memória, que em caso de reinfeção irão rapidamente diferenciar-se em plasmócitos, desencadeando uma resposta imune muito mais rápida e eficiente do que a primeira (Messerschmidt et al., 2016).

Após entrarem em circulação, as células T estão aptas a desempenhar a sua função. No entanto, para que estas sejam estimuladas e desencadeiem uma resposta imune muitos são os intervenientes necessários. Para que as células T sejam ativadas, é necessário que haja o processamento das moléculas antigénicas, e a sua posterior expressão à superfície das células apresentadoras de antígeno (APCs) através do MHC (MHC de classe I- linfócitos T citotóxicos; MHC de classe II- células Th (linfócito T auxiliar)). Quanto maior a força de ligação, maior é a ativação da célula T e conseqüentemente mais forte é a resposta imune que é desencadeada (Zinkernagel, 2002; Mantegazza, Magalhaes, Amigorena & Marks, 2013).

A classe de MHC utilizada pelas células dendríticas e as células posteriormente estimuladas está dependente da origem do antígeno. Quando as APCs apresentam péptidos exógenos, utilizam a classe II do MHC, estimulando assim as células T CD4<sup>+</sup> (*cluster of differentiation 4*<sup>+</sup>) (Th ou Treg). Contudo, se o péptido for de origem endógena (células cancerígenas por exemplo), as APCs através do MHC de classe I estimulam as células T CD8<sup>+</sup> (*cluster of differentiation 8*<sup>+</sup>) (linfócitos T citotóxicos ou células efectoras) (Zinkernagel, 2002; Mantegazza et al., 2013).

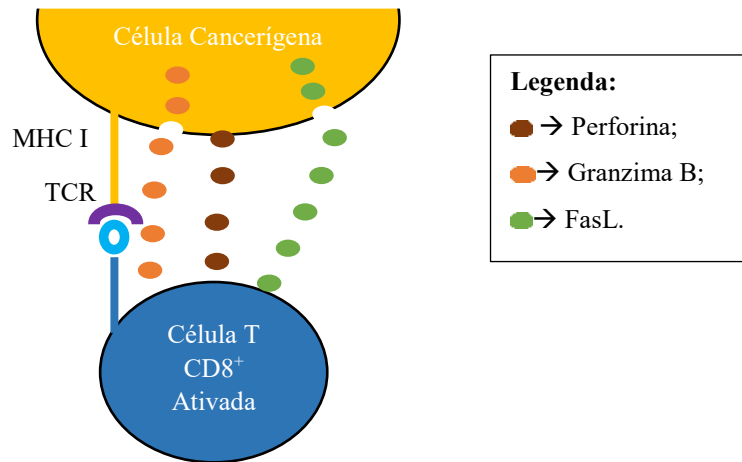
Após a ligação do TCR ao MHC de classe I ou II, a ligação é envolvida pelas moléculas acessórias, CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup> na célula T, respetivamente. Posteriormente, um

sinal co-regulador (B7, molécula co-estimulatória) é ainda emitido pela APC, promovendo a ativação total (ação positiva) da célula. No entanto, esta molécula está ainda envolvida na regulação (ação negativa) destas mesmas células. Efetivamente a interação da B7 com o recetor CD28 (*cluster of differentiation 28*) irá promover a ativação das células e como tal a eliminação do antigénio. Porém se a B7 se ligar recetor CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), também ele existente nos linfócitos T, a célula será inativada. A B7 e a sua co-regulação, acaba assim, por ser um mecanismo de regulação da atividade imunitária (Zinkernagel, 2002; Sharpe & Abbas, 2006; Greaves & Gribben, 2013; Mantegazza et al., 2013).

Assim como, uma célula infetada por um vírus, por exemplo, produz proteínas que vão ser reconhecidas como antigénios, também as células neoplásicas devido às alterações no seu ADN tendem a produzir proteínas anormais que podem desencadear uma resposta imunitária. Após a ativação das células T, pelas APCs, estas migram até à célula alvo, sintetizando ao mesmo tempo várias enzimas, que iram atuar na célula, promovendo a sua eliminação por apoptose. Na indução da apoptose intervém três moléculas, a perforina, a granzima B e o FasL (*Fas ligand*) (Rauf, Khatri, Murgia & Saif, 2012; Martin et al., 2015; Messerschmidt et al., 2016).

A perforina é responsável por criar orifícios na membrana celular da célula alvo, permitindo assim a entrada da granzima B e do FasL. Estas duas proteínas ao estarem na célula alvo induzem-na a entrar em apoptose, levando assim à eliminação da célula (figura 4). O Fas, recetor do FasL, é expresso em inúmeras células, incluindo as células tumorais (Rauf et al., 2012; Messerschmidt et al., 2016).

Tal como acontece com as células B, também as células T ativadas sofrem, após a eliminação do antigénio, uma regressão (Zinkernagel, 2002; Mantegazza et al., 2013).



**Figura 4:** Indução da apoptose da célula maligna através da ação enzimática da perforina, granzima B e do FasL sintetizadas pela célula imune (adaptado de Messerschmidt et al., 2016).

### 2.1-A imunidade na Prevenção

Com o objetivo de diminuir a suscetibilidade do ser humano a infecções e a doenças, a memória imunológica é logo desde muito cedo estimulada através da administração de vacinas. No entanto, se no passado estas mesmas vacinas apenas se cingiam ao tratamento/prevenção de por exemplo, doenças provocadas por microrganismos patogénicos, nos dias de hoje estas já abrangem a área do cancro. Com os avanços na área da oncologia, atualmente já se identificaram vários neo-antígenos em inúmeros tumores (melanoma, carcinoma de células renais, carcinoma do pulmão, entre muitos outros), tendo-se igualmente verificado que a sua existência associada a uma resposta efetiva por parte das células T consegue, em certos casos, levar a uma regressão tumoral, podendo esta ser total ou parcial (Martin et al., 2015).

De todas as células que constituem o microambiente tumoral, os TAMs são aqueles que mais frequentemente são encontrados. Uma vez que estas células têm a capacidade de funcionar como promotores tumorais; de promover a angiogénese; a invasão e a migração das células malignas, acabando assim por também atuar na metastização. Deste modo, facilmente se percebe que níveis elevados destas células não é indicativo de um bom prognóstico. No entanto, em determinados cancros como no melanoma, no cancro invasivo do cólon e no cancro do pâncreas, a existência de elevados níveis de CTLs (linfócitos T citotóxicos) e Ths é indicativo de um bom prognóstico. Desta

forma, demonstra-se mais uma vez a dualidade do sistema imunitário e da inflamação que lhe está associada face ao cancro (Grivennikov et al., 2010; Balkwill et al., 2012).

Devido às inúmeras funções que as citocinas e as quimiocinas apresentam, facilmente se depreende que estas, muito provavelmente, acabam por influenciar mais o desenvolvimento tumoral do que o próprio teor de células específicas do sistema imunitário. Independentemente disso, a verdade é que a inflamação não funciona sem o sistema imunitário e vice-versa, sendo ambos imprescindíveis na promoção ou regressão tumoral, como referido anteriormente (Balkwill et al., 2012).

Apesar de a utilização das células imunes no combate ao cancro apresentar um enorme potencial, como baixa toxicidade (em comparação com outros tipos de tratamento), elevada especificidade e a geração de memória, ainda é necessário aprofundar e melhorar os conhecimentos no campo da imunidade anti-tumoral (Martin et al., 2015; Sharma & Allison, 2015a).

## **2.2- Antígenos Tumorais**

Os antígenos tumorais dividem-se em duas classes, os antígenos com elevada especificidade tumoral, como é o caso os antígenos virais, e os antígenos com baixa especificidade tumoral, como por exemplo o fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) e os antígenos de diferenciação. Cada uma destas classes apresenta características e mecanismos específicos, que podem ou não favorecer a aplicação da imunoterapia (Vigneron, 2015).

O Vírus do Papiloma Humano (VPH) é um exemplo de um microrganismo capaz de sintetizar proteínas virais (E6 e a E7) que têm a capacidade induzir a formação de um tumor. Desta forma, a E6 e a E7, ao terem potencial de serem reconhecidas pelo sistema imunitário, e ao conseguirem desencadear uma resposta imunitária estruturada e eficiente, acabam assim, por ser alvos ideais para a imunoterapia (Vigneron, 2015).

A sobre-expressão do HER2 ocorre em cerca de 30% dos cancros da mama, estando diretamente associado a um mau prognóstico e à agressividade da doença. Também no cancro do ovário, do pulmão, do cólon, e em muitos outros, este oncogene encontra-se sobre-expresso (Srinivasan & Wolchok, 2004).

Existem também antígenos de diferenciação, que são específicos de cada linhagem celular, como é o caso do MART1 (antígeno do melanoma, reconhecido por células T 1), da gp100 (glicoproteína 100, proteína antigénica do melanoma) e da

tirosinase presentes no melanoma, que são expressos tanto nas células saudáveis como nas células tumorais (Srinivasan & Wolchok, 2004).

A sobre-expressão do HER2 no cancro da mama e a expressão do MART1, da gp100 e da tirosinase no melanoma, demonstram assim, que nem todos os antígenos tumorais podem ser utilizados na imunoterapia. Uma vez que estes são expressos nos tecidos saudáveis, e como tal, devido à seleção negativa que ocorre no timo as células imunitárias apresentam uma baixa afinidade para os mesmos, não são capazes de gerar uma forte resposta imune. No entanto, este não é o único problema. Se realmente se tentasse estimular as células imunitárias contra estas moléculas, o risco de se desenvolver toxicidade autoimune seria muito elevado. Assim, torna-se importante estudar e seleccionar cuidadosamente os antígenos a utilizar na imunoterapia, para que os benefícios sejam largamente superiores aos riscos (Srinivasan & Wolchok, 2004; Vigneron, 2015).

### **2.3- A Regressão Espontânea dos Tumores versus fuga ao Sistema Imunitário**

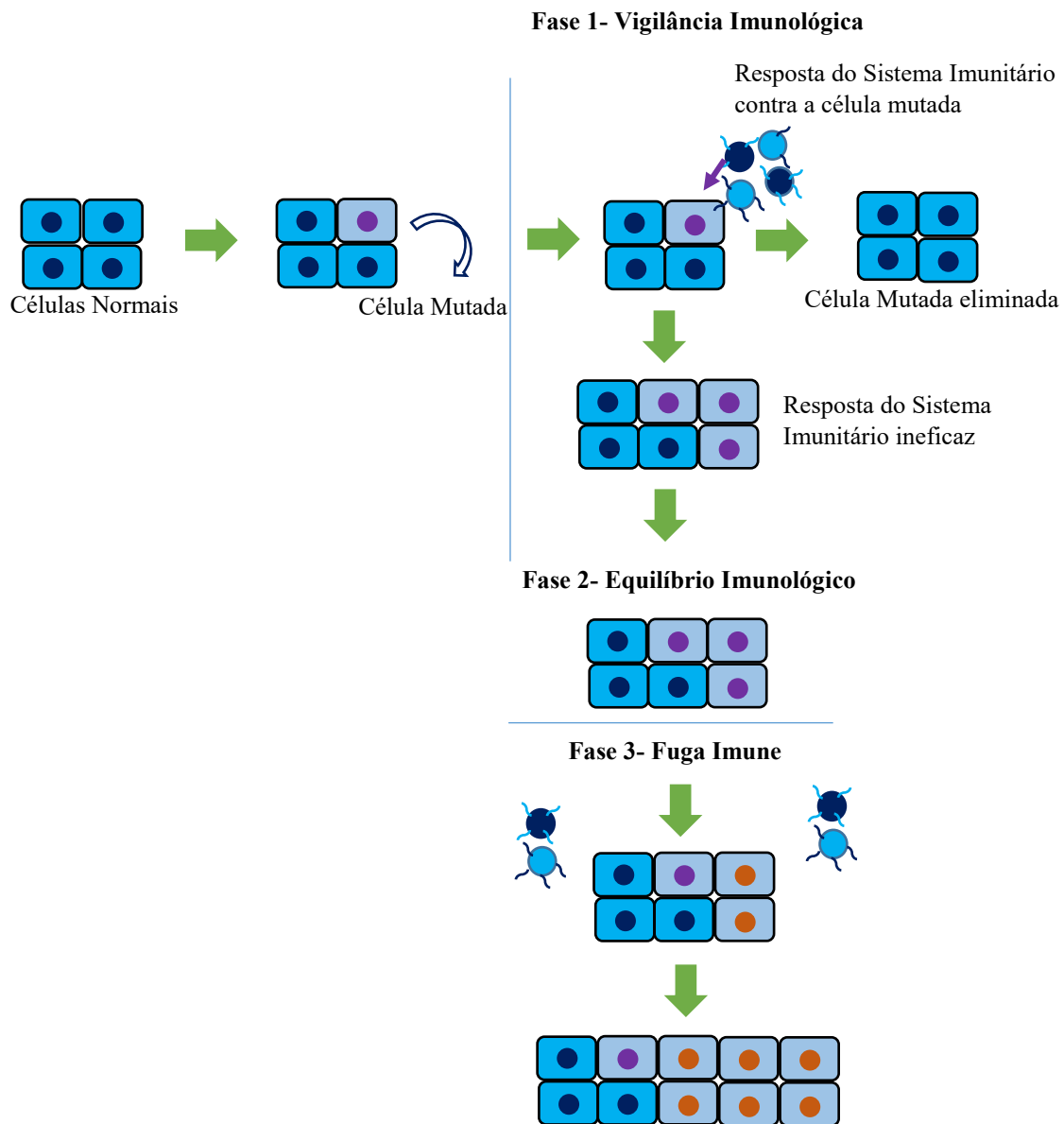
O conceito de regressão espontânea de tumores não é novo, bem pelo contrário, é um fenómeno que já se observa e se tem conhecimento há centenas de anos (Jessy, 2011). De facto, apesar de ser muito raro, existem tumores que regridem espontaneamente sem qualquer tipo de intervenção externa. Estas regressões são mais vulgares no carcinoma de células renais, linfoma, leucemia, melanoma maligno, entre outros (Messerschmidt et al., 2016).

Não se sabe muito bem, quais os fatores que promovem tal regressão espontânea, no entanto, pensa-se, que devido a algum fator desconhecido, o sistema imunitário do individuo adquire ao longo do desenvolvimento tumoral a capacidade de reconhecer os neo-antígenos, e deste modo, torna-se capaz de desenvolver uma forte resposta imunitária contra o tumor, levando à sua regressão. Assim, apesar de não se perceber muito bem o porquê, verificou-se desde muito cedo, que o sistema imunitário apresentava a capacidade de detetar e eliminar células malignas (Ricci & Cerchiari, 2010; Jessy, 2011).

Foi no século XX que esta capacidade do sistema imunológico foi caracterizada pela primeira vez, denominando-se vigilância imunológica. No entanto, apesar desta descoberta, a verdade é que continuavam a existir células malignas que se conseguiam estabelecer e originar doenças oncológicas. Assim, mais tarde, um novo conceito,

*Immunoediting*, juntou-se ao anterior (Dunn, Bruce, Ikeda, Old & Schreiber, 2002; Kim et al., 2007).

O *Immunoediting* divide-se em 3 fases: a vigilância imunológica, o equilíbrio imunológico e a fuga imune. Na primeira fase, as células mutadas são eliminadas eficientemente pelo sistema imunitário. No entanto, existem determinadas células malignas que conseguem adquirir características que lhes permitem sobreviver a esta fase. Assim, estas células começam a proliferar e a originar descendência. Contudo, a partir de uma determinada altura, é estabelecido um equilíbrio (segunda fase), no qual não há nem regressão nem promoção tumoral. Esta fase assemelha-se a uma dormência, na qual tanto as células tumorais lutam pela sua sobrevivência, como as células do sistema imunitário lutam pela eliminação das células cancerígenas. Ao longo de todo este processo, as células tumorais resultantes são cada vez menos imunogénicas, devido às pressões exercidas pelas células imunitárias que promovem a sua seleção, e apresentam um maior número de alterações genómicas. A fuga imune ocorre quando as células malignas adquirem características que lhes permitem não ser detetadas pelas células imunitárias. Assim, o crescimento das células tumorais que anteriormente estava condicionado, deixa de estar, e o tumor recomeça assim a desenvolver-se, e mais tarde as células malignas irão invadir os tecidos circundantes e metastizar-se (figura 5) (Kim et al., 2007).



**Figura 5:** *Immunoediting*<sup>1</sup>. -Através de alterações que ocorrem normalmente ao nível do genoma, uma célula maligna é originada. Esta ao ser detetada pelo sistema imunitário (vigilância imunológica) é eliminada. No entanto, se a célula maligna conseguir persistir à atividade das células imunes, esta começa a proliferar. O sistema imunitário continua porém, a atuar sobre estas células, impedindo o crescimento do tumor (equilíbrio imunológico). Só mais tarde, após a aquisição de características que permitem às células mutadas não ser detetadas pelo sistema imunológico (fuga imune), é que estas conseguem promover o desenvolvimento de um cancro.

<sup>1</sup> Figura da minha autoria, baseada no texto citado por Kim et al. (2007).

## Capítulo IV- Terapêuticas Aplicadas ao Cancro

### 1- Terapêuticas Atuais e a Inflamação

As três principais formas de tratamento do cancro, cirurgia, quimioterapia e radioterapia, induzem inflamação, uma vez que originam lesões tecidulares e/ou necrose das células cancerígenas (Forget, Simonet & Kock, 2013; Vyas et al., 2014; Schaue et al., 2015).

A cirurgia, muito utilizada no tratamento de tumores sólidos como é o caso do cancro da mama, apesar de apresentar muitos benefícios, pode funcionar como um potenciador da progressão tumoral. De facto, a realização de uma cirurgia envolve obrigatoriamente a formação de um processo inflamatório. Deste processo resulta a síntese de vários mediadores de angiogénese, que associados a um período de imunossupressão aumentam muito o risco de metastização. No entanto, existem muitos outros fatores que podem acentuar este fenómeno (Forget et al., 2013).

Tanto a radioterapia como a quimioterapia possuem a capacidade de originar uma forte resposta inflamatória devido à necrose celular e aos mediadores inflamatórios por estas células libertados (ATP (adenosina trifosfato), ácidos nucleicos, citocinas, HMGB1) (Degenhardt et al., 2006; Vyas et al., 2014; Schaue et al., 2015).

Em qualquer uma das terapêuticas, o papel que a inflamação apresenta no cancro não é específico, podendo tanto funcionar a seu favor como contra (Degenhardt et al., 2006; Vyas et al., 2014; Schaue et al., 2015). No cancro da próstata dependente de androgénios, a castração, que induz a morte celular, acaba por promover o desenvolvimento tumoral, devido a processos inflamatórios (Ammirante, Luo, Grivennikov, Nedospasov & Karin, 2010). Efetivamente, quando a inflamação é induzida por necrose, devido por exemplo a fenómenos de hipoxia, esta acaba por normalmente favorecer o crescimento tumoral. No entanto, a necrose associada à quimioterapia (oxaliplatina e cisplatina), devido à libertação dos mediadores inflamatórios, pode também favorecer a eliminação das células malignas, através do aumento da apresentação de neo-antígenos pelas células dendríticas e da estimulação da imunidade adaptativa através da IL-1 $\beta$  (Kujawski et al., 2008; Rius et al., 2008; Joyce & Pollard, 2009; Tesniere et al., 2009; McDonnell, Robinson & Currie, 2010). A partir da HMGB1 e do ATP, libertados durante o processo necrótico, o TLR4 (*toll-like receptor 4*), expresso por

exemplo em células dendríticas, e o inflamassoma são ativados, respetivamente, estimulando assim a síntese de IL-1 $\beta$  (Apetoh et al., 2007a, 2007b; Ghiringhelli et al., 2009; He, 2016).

Como a inflamação apresenta um papel tão importante no cancro, várias moléculas anti-inflamatórias são hoje em dia utilizadas em conjunto com as terapêuticas convencionais. Estas moléculas, como por exemplo os inibidores da COX2 (Ciclo-oxigenase-2), a aspirina e a dexametasona, apesar de não terem ação direta sobre as células malignas (não serem citocidas), ao atuarem na inflamação e nos seus mediadores afetam ou previnem o desenvolvimento do cancro (Gierach et al., 2008).

A aspirina por exemplo tem a capacidade de estimular a produção de linfotóxina (promove a necrose das células). No entanto, para que a produção deste fator seja suficientemente elevada é necessário que o indivíduo seja portador de um polimorfismo específico ao nível do gene que codifica a linfotóxina alfa (LTA) (genótipo LTA + 80CC). Atualmente a aspirina apresenta efeitos benéficos, no cancro da mama, da próstata e do cólon. Contudo, apesar dos seus benefícios, os anti-inflamatórios não esteroides (AINES), como a aspirina, apresentam inúmeros efeitos adversos, como tal a sua utilização a longo prazo não é recomendada, a não ser em casos em que o benefício clínico seja superior e compense os riscos (Liu, Plummer, Nock, Casey & Witte, 2006; Gierach et al., 2008).

Nos dias de hoje existem já inúmeras estratégias, moléculas e terapêuticas combinadas que tentam alcançar a remissão total ou pelo menos parcial do cancro. No entanto, isso nem sempre é possível. Por outro lado, a quimioterapia e a radioterapia, por não serem seletivas e devido ao mecanismo de ação que apresentam afetam também as células saudáveis em proliferação e por isso acabam por lesar e muito o hospedeiro. Estes efeitos secundários são tais que em alguns casos podem mesmo impossibilitar o indivíduo de prosseguir com o tratamento. A cirurgia, por outro lado, apesar de não apresentar muitos efeitos adversos, acaba por ter várias limitações, como o tipo de tumor, o tamanho, a localização e a disseminação do mesmo. Neste contexto e na expectativa de desenvolvimentos futuros, a imunoterapia poderá ser a chave para uma nova fase no tratamento do cancro (Degenhardt et al., 2006; Forget et al., 2013; Vyas et al., 2014; Schaeue et al., 2015).

## 2- O Papel da Sequenciação de Última Geração na Imunoterapia

Nos últimos anos a imunoterapia tem-se destacado cada vez mais, tendo para isso contribuído e muito a NGS. Nos últimos tempos, a NGS foi um dos maiores avanços na medicina personalizada e no diagnóstico do cancro que permitiu a sequenciação de todo o exoma e transcriptoma, obtendo-se assim todo um repertório de neo-antígenos que podem posteriormente ser utilizados no combate ao cancro. A partir do momento que se conseguiu aprofundar os conhecimentos acerca do genoma e dos mecanismos de promoção tumoral das células malignas conseguiu-se também melhorar e muito as terapêuticas utilizadas no combate ao cancro, assim como desenvolver novas. Efetivamente, o genoma das células tumorais é uma importante fonte de informação que permite criar e desenvolver estratégias terapêuticas mais eficazes e seletivas. Proteínas que resultam de mutações somáticas (erros que ocorrem durante a replicação do ADN) são alvos ideais, no combate ao cancro, uma vez que estas apenas são expressas pelas células malignas. Com base nestas descobertas, vários centros dedicados ao estudo do cancro implementaram programas de identificação de terapias-alvo a partir dos dados genómicos (Illumina, s.d.a; Diken, Kreiter, Kloeke & Sahin, 2015; Martin et al., 2015; Straten & Garrido, 2016).

A partir das informações obtidas com a NGS, conseguiu-se desenvolver, melhorar e compreender as terapêuticas imunomoduladoras. Esta técnica teve por isso um papel crucial na terapêutica convencional, na ACT, no desenvolvimento de vacinas personalizadas e no bloqueio do *checkpoint* imunológico. As suas aplicações vão no entanto, para além da área da oncologia, exemplo disso é a sua utilização na Microbiologia (Illumina, s.d.a; Behjati & Tarpey, 2013; Diken et al., 2015; Martin et al., 2015).

A NGS é atualmente utilizada para caracterizar o repertório imunológico do microambiente tumoral, em tempo real, funcionando também como um monitor altamente sensível da expansão celular em relação ao desenvolvimento tumoral ou ao seu tratamento. É também utilizada na predição de neo-antígenos (Illumina, s.d.a).

No entanto, a NGS, apresenta ainda algumas limitações, nomeadamente a aquisição de pessoal devidamente habilitado, o investimento de capital inicial necessário, a otimização do processo de forma a torná-lo rentável e por último mas mais importante, a aquisição de uma infraestrutura que permita, não só armazenar, como consultar de forma segura e rápida os dados obtidos (Behjati & Tarpey, 2013).

Desde 2005, altura em que a NGS surgiu, várias foram as questões sem resposta que foram finalmente esclarecidas. Esta tecnologia, com as suas características únicas e inovadoras, desempenha um papel cada vez mais relevante na oncologia. Com o tempo, conseguir-se-ão obter novos dados, que permitirão desenhar novos alvos e delinear novas estratégias para a imunoterapia. Exemplo disso foi o seu contributo na ACT e no bloqueio do *checkpoint* imunológico, uma vez que a NGS desvendou a relação e a influência que as células T, específicas de antígenos tumorais, tinham neste tipo de terapêuticas (Chapman, Warren & Wu, 2012; Martin et al., 2015).

O genoma das células malignas é tão diversificado, que se torna extremamente importante aprofundar os conhecimentos à cerca deste. É através destas alterações que as células tumorais adquirem características que lhes permitem proliferar, metastizar-se, escapar à resposta imunitária, entre outros. Apesar dos inúmeros benefícios e conhecimentos que a NGS alcançou, ainda há um longo caminho a percorrer. Por outro lado, a NGS poderá futuramente, abrir portas para uma seleção muito mais cuidada e precisa do tratamento mais adequado para cada indivíduo, pois este tratamento terá em conta as características intrínsecas do indivíduo e do tumor (Illumina, s.d.b).

### 3- Áreas Terapêuticas Ligadas ao Sistema Imunológico

Como já foi referido anteriormente, o sistema imunitário tem a capacidade e a função de proteger e manter a homeostasia do organismo. No entanto, apesar da sua enorme importância, a verdade é que este está envolvido em várias doenças, como o cancro. Efetivamente, a ação das células imunitárias pode tanto promover a eliminação das células malignas, como o desenvolvimento tumoral. Várias são as células e os mediadores que determinam para que lado a balança irá pender (Caspi, 2008; Ilumina, s.d.a; Vigneron, 2015).

A partir dos conhecimentos sobre o sistema imunitário e da identificação de antígenos específico de tumor (neo-antígenos), muitas foram as estratégias desenvolvidas para tornar o sistema imunitário capaz de combater o cancro (Diken et al., 2015).

A imunoterapia tem como objetivo aumentar a ação e eficácia do sistema imunitário, de modo, a que este seja capaz de detetar e eliminar as células malignas. Atualmente a imunoterapia abrange três campos:

- Inibidores do *checkpoint*;
- Vacinas;
- Transferência celular adotiva (ACT) (Ilumina, s.d.a; Caspi, 2008).

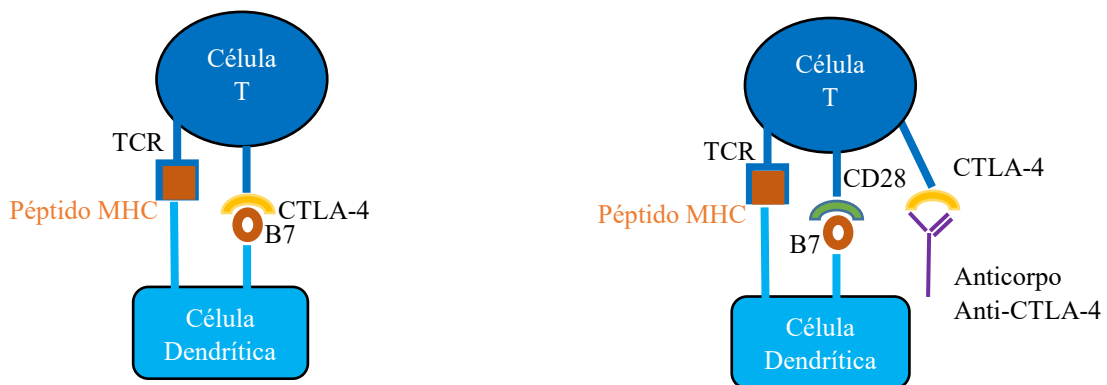
#### 3.1- O *Checkpoint* imunológico

O *checkpoint* é um mecanismo muito importante na regulação da resposta imunitária. Com a ativação das células imunes, determinados recetores são expressos à sua superfície celular. Estes recetores, uma vez estimulados promovem a inativação das células imunitárias. Assim, com a inibição destes recetores, o sistema imunitário mantém-se ativo, sendo esta a base deste tipo de imunoterapia (Sharma & Allison, 2015b).

As células T são ativadas por diversos mecanismos, mecanismos estes que necessitam da interação de várias moléculas ao longo do processo. Como já descrito, para que as células T sejam ativadas, os TCRs têm de interagir com os antígenos através do MHC. No entanto, esta interação não é suficientemente forte para desencadear a sua ativação total, sendo por isso necessário a intervenção de outros mediadores para que se desenvolva uma resposta imune eficaz. Fazem parte desses mediadores o CD4<sup>+</sup>, expresso à superfície das células T auxiliares que envolve a ligação antígeno/MHC II; e o CD8<sup>+</sup>, presente nos linfócitos T citotóxicos, que envolve a ligação antígeno/MHC I. Através

destas interações consegue-se aumentar a sensibilidade das células T em relação aos antígenos. Contudo, a interação específica entre MHC/péptido/TCR acaba ainda por não ser suficiente para que seja desencadeada uma ativação completa das células. Assim, para uma ativação completa é necessário que a partir das APCs haja a ligação da B7, molécula co-estimulante, às células T. A proteína B7 é expressa pelas APCs, nomeadamente pelas células dendríticas, mas também é expressa em outras células, como é o caso das células B. Esta proteína pode tanto ligar-se ao recetor CD28, como ao recetor CTLA-4 presentes nas células T. A interação entre a B7 e o CD28 é o principal mecanismo de estimulação das células T *naïve*, sendo esta interação essencial para que ocorra a sua ativação. Por outro lado, a ligação da B7 ao CTLA-4 (um inibidor da proliferação dos linfócitos T) inibe a ativação das células T, apresentando este recetor, maior afinidade para a B7, comparativamente ao CD28. Devido à sua ação, o CTLA-4 acaba por ser assim, um recetor de inibição, que limita a ativação das células imunitárias, levando, por isso, a uma menor produção de IL-2 e à supressão da resposta das células T (figura 6) (Zinkernagel, 2002; Sharpe & Abbas, 2006; Greaves & Gribben, 2013; Mantegazza et al., 2013; Male, Brostoff, Roth & Roitt, 2014; Patrick, Pfaller & Kem, 2014; Abbas et al., 2015).

Quando os linfócitos T são ativados há um aumento da síntese de IL-2, sendo esta responsável por inúmeras funções como: a estimulação da sobrevivência, proliferação e diferenciação das células T ativadas (Patrick et al., 2014; Abbas et al., 2015).



**Figura 6:** Inativação da via supressora das células T, CTLA-4, através do uso de um anticorpo monoclonal anti-CTLA-4 (adaptado de Ilumina, s.d.a).

À medida que a célula T vai amadurecendo, o número de recetores CTLA-4 expressos aumenta. Assim, para que estas células sejam ativadas são necessários estímulos cada vez mais fortes (Male et al., 2014).

Em 2011, a FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou um anticorpo monoclonal anti-CTLA-4, o ipilimumab (Yervoy®), para o uso clínico em indivíduos com melanoma metastático. Atualmente estão a decorrer ensaios clínicos onde se avalia a sua utilização no tratamento de outros tumores sólidos, como é o caso do cancro da próstata e do pâncreas (tabela 1 em anexo) (Resumo das características, 2011; Acharya & Jeter, 2013; Sharma & Allison, 2015b).

Pra além do CTLA-4, também o recetor da morte celular programada-1 (PD-1) permite às células malignas “escapar” à ação das células T (Ilumina, s.d.a).

O ligando PD-L1 (ligando-1 do recetor da morte celular programada), expresso à superfície celular de células dendríticas, de algumas células cancerígenas e de células endoteliais e epiteliais, ao interagir com o PD-1, induz as células a entrar em apoptose. Assim, as células malignas ao expressarem este ligando induzem as células T, que possuem o recetor PD-1, a entrar em apoptose, impedindo assim que o sistema imunitário consiga eliminá-las (Ilumina, s.d.a).

Em 2014 dois anticorpos anti-PD-1, pembrolizumab (Keytruda®) e nivolumab (Opdivo®) foram aprovados pela FDA (figura 7), tendo já nesta altura demonstrado resultados promissores em vários tipos de cancro, como é o caso do melanoma, do CPCNP, do carcinoma de células renais, do cancro da bexiga e do linfoma de Hodgkin (Sharma & Allison, 2015a, 2015b; Resumo das Características, 2015a, 2015b; Le et al., 2015).

Atualmente, estes dois anticorpos estão indicados no tratamento do melanoma avançado em adultos (podendo ao nivolumab ser associado ao ipilimumab), do CPCNP (após quimioterapia), estando ainda o nivolumab indicado no tratamento do carcinoma de células renais em adultos que já tenham realizado previamente uma terapêutica (tabela 1 em anexo) (Resumo das Características, 2015a, 2015b).

Com a utilização destes anticorpos, consegue-se assim impedir a estimulação de vias que iriam inibir ou diminuir a ativação do sistema imunitário, permitindo desta forma, que as células T sejam e permaneçam ativas no combate às células tumorais. Contudo, ambas as vias, CTLA-4 e PD-1, são vias de regulação imprescindíveis para a manutenção de um sistema imunitário regulado. Consequentemente, a utilização deste

tipo de imunoterapia poderá desencadear efeitos autoimunes (Abbas et al., 2015; Redman, Gibney & Atkins, 2016).



**Figura 7:** Bloqueio da via indutora da apoptose, PD-1, através da utilização de um anticorpo monoclonal anti-PD-1 (adaptado de Ilumina, s.d.a).

### 3.1.1- Evidências Científicas

Desde a introdução dos inibidores do *checkpoint* no tratamento do melanoma, os resultados clínicos obtidos melhoraram drasticamente (Redman et al., 2016).

No caso do nivolumab, a sua associação com o ipilimumab demonstrou ser muito mais eficaz do que o seu uso em monoterapia. Efetivamente, a sua combinação, alcançou taxas de resposta, na eliminação das células malignas, superiores; uma diminuição mais acentuada do tumor assim como uma maior sobrevida livre de progressão tumoral (Redman et al., 2016).

Num modelo de sarcoma murino verificou-se que o uso de anticorpos anti- PD-1 e anti- CTLA-4, permitiu ativar fortemente as células T, que se encontravam infiltradas no tumor, contra as células malignas, tendo as células imunitárias mediado um efeito anti-tumoral bastante pronunciado (Martin et al., 2015).

No melanoma metastático não operável, verificou-se que o efeito induzido pelo bloqueio imunológico do *checkpoint*, através de anticorpos anti-PD-1, apresentou uma baixa toxicidade (em comparação com a IL-2 por exemplo) e uma elevada atividade anti-tumoral. Qualquer um dos três anticorpos monoclonais, em ensaios clínicos, conseguiu aumentar a expectativa de vida (em meses e em alguns casos em anos) de indivíduos com melanoma avançado (Chustecka, 2016; Redman et al., 2016).

Existem atualmente vários ensaios clínicos a decorrer nos quais se avalia a eficácia destes inibidores noutros tipos de cancro e se estuda o potencial de novas moléculas (Gelao, Criscitiello, Esposito, Goldhirsch & Curigliano, 2014).

### 3.1.2- Efeitos Adversos

Devido ao seu mecanismo de ação, os efeitos adversos que podem surgir com o uso deste tipo de tratamento estão relacionados com fatores imunes. No entanto, caso sejam utilizados agentes que possuam a capacidade de modular a ação do sistema imunitário, estes efeitos adversos conseguem ser tolerados ou mesmo controlados. O uso de corticosteroides, por exemplo, permite atenuar os efeitos secundários dos inibidores do *checkpoint* sem, no entanto, interferir com a sua atividade (Sharma & Allison, 2015a).

Apesar de não existir nenhuma diferença significativa entre os efeitos adversos causados pelos inibidores do CTLA-4 e do PD-1, a verdade é que os anticorpos anti-PD-1 apresentam menor toxicidade (Sharma & Allison, 2015a).

O ipilimumab, ao intervir diretamente no mecanismo de regulação das células imunes, apresenta um grande potencial de desenvolvimento de doenças autoimunes. Na presença de um tumor, a existência de um sistema imunitário altamente ativo contra as células tumorais é bastante importante. No entanto, quando estas células tumorais são eliminadas na sua totalidade, a ativação do sistema imunitário deixa de ser necessária. Porém, se o recetor CTLA-4, que permite esta inativação, continuar bloqueado, a célula imune irá permanecer ativa. Assim, na ausência de um mecanismo eficaz de regulação do sistema imunitário, não só as células T que atuavam especificamente sobre as células tumorais, mas também aquelas que se encontravam reguladas, começam mais tarde ou mais cedo a atuar sobre as células somáticas do indivíduo, originando assim uma ação autoimune (Bertrand, Kostine, Barnette, Truchetet & Schaeffer, 2015).

Os efeitos adversos mais comuns que surgem com este tipo de terapêutica encontram-se descritos com maior pormenor na tabela 2 em anexo.

### 3.1.3- O Futuro

As terapêuticas que possuem como alvo específico as vias regulatórias das células T (*checkpoint*) têm melhorado muito a ação das células imunitárias contra as células tumorais. Esta abordagem tem proporcionado uma melhoria clínica acentuada e duradoura em muitos indivíduos (Sharma & Allison, 2015b).

Apesar dos inúmeros benefícios clínicos alcançados com a utilização destes anticorpos, a verdade, é que ainda há um longo caminho a percorrer. Para além, de ser necessário aprimorar as terapêuticas existentes, ainda é necessário compreender melhor a relação entre o cancro e o sistema imunitário. Através de estudos realizados ao longo do tempo, sabe-se hoje que tanto as características do tumor, como as do sistema imunitário do hospedeiro influenciam as respostas adquiridas com os inibidores do *checkpoint*. Deste modo, o desenvolvimento de métodos e técnicas que permitam detetar essas características irão no futuro promover uma prestação de cuidados de saúde mais individualizada, com uma maior qualidade e especificidade. Efetivamente, a partir das características intrínsecas do tumor e do indivíduo conseguir-se-á, no futuro, optar pelo tratamento mais adequado para cada caso (Snyder et al., 2014; Sharma & Allison, 2015b).

Outra questão que necessita de ser aprofundada é a relação entre a carga mutacional e o resultado que é obtido com o tratamento. Em muitos tipos de cancro, com uma elevada carga mutacional, como é o caso do melanoma, verificou-se que a taxa de resposta aos inibidores do *checkpoint* era mais elevada. Efetivamente, verificou-se que, quanto maior fosse a carga mutacional, melhores seriam os resultados obtidos com o uso dos anticorpos (Snyder et al., 2014; Le et al., 2015).

Daqui em diante, através da identificação de biomarcadores de prognóstico, de novos neo-antígenos, do desenvolvimento de novas moléculas e terapêuticas, assim como, do aumento do conhecimento sobre o sistema imunitário e dos componentes inflamatórios intrínsecos à sua atividade, alcançar-se-á outro patamar no tratamento do cancro e na terapêutica do *checkpoint* imunológico (Sharma & Allison, 2015b).

Existem, no entanto, outras variáveis que devem ser consideradas, como é o caso da flora intestinal (que faz parte do microbioma). São várias as evidências que demonstraram que o microbioma influencia e muito a resposta imunológica. Uma vez que a base da imunoterapia consiste na utilização do sistema imunitário do indivíduo no combate ao cancro, torna-se assim, também importante, estudar os vários fatores que a podem influenciar (Sivan et al., 2015).

Atualmente são muitos os ensaios clínicos onde se combinaram a imunoterapia e a quimioterapia, tendo estes, alcançado resultados muito promissores. Assim, talvez a combinação de terapêuticas se torne a chave para a obtenção de melhores resultados no tratamento do cancro (Sharma & Allison, 2015a).

### 3.1.4- O Microbioma

Apesar de ainda não se compreende muito bem quais são os fatores que influenciam a resposta imunológica no combate ao cancro, uma das hipóteses equacionada relaciona-se com o microbioma. Efetivamente, são muitos os estudos que indicam que certos microrganismos possuem a capacidade de afetar a resposta imune, tornando-a mais eficaz (Sivan et al., 2015).

Um estudo realizado por Vétizou et al. (2015) demonstrou que determinadas espécies de *Bacteroides* têm a capacidade de influenciar a resposta ao bloqueio do CTLA-4. Neste estudo, em que se utilizaram ratos como cobaias, verificou-se que a presença ou contacto com estes microrganismos (*Bacteroides fragilis*) favorecia a resposta imunológica, sendo o ataque às células malignas mais potente e eficaz. Por outro lado, as cobaias que inicialmente não tinham tido contacto com estas bactérias, não estavam a responder de forma eficaz à terapêutica. Facto este alterado após, por exemplo, a ACT de células T específicas de *Bacteroides fragilis* (Vétizou et al., 2015).

Num outro estudo realizado por Sivan et al. (2015), comparou-se a influência da *Bifidobacterium* na progressão do melanoma. Com a realização deste estudo verificou-se que a existência deste microrganismo influenciava em muito a atividade anti-tumoral espontânea do sistema imunitário, melhorando-a (Sivan et al., 2015).

Juntos, estes estudos demonstram a influência que o microbioma tem na resposta imunitária, mostrando assim, que através da sua manipulação pode-se conseguir alcançar melhores resultados com a imunoterapia (Sivan et al., 2015; Vétizou et al., 2015).

### 3.1.5- A Indolamina-2,3-dioxigenase

A IDO, uma enzima intracelular, é expressa por vários grupos celulares, como é o caso de células do pulmão, da placenta, de células dendríticas, de macrófagos, entre muitas outras (Moon, Hajjar, Hwu & Naing, 2015).

A atividade anormal desta enzima tem sido associada ao longo do tempo a inúmeras patologias, como é o caso de doenças autoimunes, depressão, obesidade e doenças oncológicas. As células tumorais, também possuem a capacidade de sintetizar esta enzima, sendo através do seu mecanismo de ação que induzem tolerância imunológica (Moon et al., 2015).

A IDO, uma vez ativada, a partir do catabolismo do triptofano, sintetiza a quinurenina (metabolito). O aumento deste metabolito, assim como a diminuição do triptofano, favorecem assim a inibição da atividade dos linfócitos T (por diminuição da

sua proliferação, por indução da sua apoptose e pelo aumento da atividade das células Treg), promovendo assim a tolerância imunológica. Desta forma a IDO tem a capacidade de provocar alterações no microambiente tumoral que favorecem o desenvolvimento do cancro (Prendergast, 2011; Moon et al., 2015; Platten, Doeberitz, Oezen, Wick & Ochs, 2015).

Recentemente verificou-se que a IDO é expressa em inúmeros cancros, como é o caso do cancro da mama, gástrico, no melanoma e muitos outros, sendo em alguns casos sobre-expressa (Moon et al., 2015; Messerschmidt et al., 2016).

Apesar do seu papel no cancro, a IDO também apresenta um papel muito importante na regulação do sistema imunitário, sendo esta enzima ativada sempre que este se encontra excessivamente ativo. Efetivamente, quando a B7 atua sobre o recetor CTLA-4, a IDO é ativada. Através do seu mecanismo de ação esta suprime a atividade exagerada das células imunitárias (Messerschmidt et al., 2016).

Apesar de ainda ser necessário aprofundar e desenvolver conhecimentos neste campo, as informações obtidas até ao momento indicam que a utilização em monoterapia de moléculas que interferem com a IDO não são à partida suficientes para desencadear uma resposta anti-tumoral eficaz. Assim, as estratégias futuras devem passar pela combinação destas moléculas com as terapêuticas imunológicas já existentes (Platten et al., 2015).

### 3.1.6-Atezolizumab e Ventana PD-L1

O atezolizumab e o ventana PD-L1 foram este ano (2016) aprovados condicionalmente pela FDA (*American Association for Cancer Research*, 2016; Mullane & Bellmunt, 2016; Schats et al., 2016).

O atezolizumab (Tecentriq®), um anticorpo anti-PD-1 está indicado para o tratamento do carcinoma urotelial (o cancro da bexiga mais comum) (*American Association for Cancer Research*, 2016; Mullane & Bellmunt, 2016; Schats et al., 2016).

Nos EUA este anticorpo monoclonal está aprovado como terapêutica de segunda linha para o carcinoma urotelial, aguardando aprovação para ser utilizado como segunda linha no tratamento do CPCNP (Markham, 2016).

O ventana PD-L1 (*Ventana Medical Systems*) é um sistema de diagnóstico complementar, que permite detetar a expressão do PD-L1 em células tumorais. A sua utilização possibilita, assim, determinar se as células tumorais expressam ou não a

proteína PD-L1 e prever quais os indivíduos que irão responder melhor à terapêutica com os anticorpos anti-PD-1 (Quon et al., 2016; Smith, 2016).

A aprovação deste anticorpo e deste sistema são a prova de que a imunoterapia, enquanto tratamento do cancro, ainda se encontra na sua fase inicial.

### 3.2- Vacinas

Na imunoterapia as vacinas têm sido exploradas desde 1980 (Illumina, s.d.a).

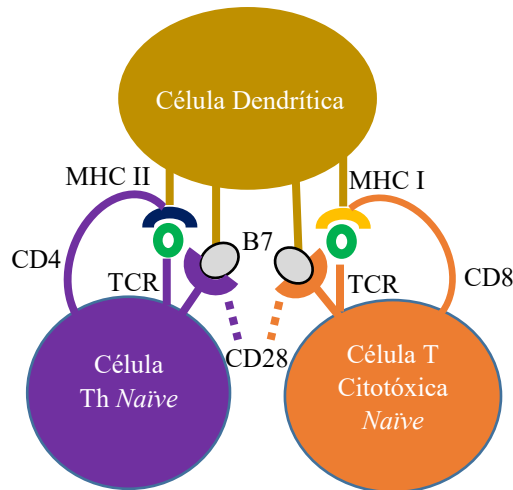
A utilização de vacinas no tratamento do cancro tem como objetivo estimular o sistema imunitário do hospedeiro para um determinado neo-antigénio, promovendo a destruição do tumor (Xu, Chow, Lim & Li, 2014).

Devido à capacidade que a vacinação tem em induzir uma resposta imune duradoura no tempo, este tipo de imunoterapia apresenta um enorme potencial. No entanto, apesar de bastante promissora, a verdade é que a produção deste tipo de terapêutica apresenta vários obstáculos (Xu et al., 2014).

A 29 de abril de 2010, a FDA aprovou a primeira vacina anticancerígena, a Sipuleucel-T, para o tratamento do cancro da próstata metastizado resistente à castração (tabela 1 em anexo) (Resumo das Características, 2013; Hammerstrom, Cauley, Atkinson & Sharma, 2011; Messerschmidt et al., 2016).

Como já foi anteriormente mencionado, é a partir dos neo-antigénios apresentados pelas APCs às células T que o sistema imunitário é ativado contra as células malignas. Foi com base neste conceito que a Sipuleucel-T foi criada. Neste tipo de imunoterapia, células mononucleares são retiradas do sangue periférico do indivíduo com cancro da próstata, através de leucaforese. Posteriormente, as células são cultivadas *in vitro* e tratadas com a proteína de fusão fosfatase ácida prostática (PAP) (uma molécula que está presente na maior parte das células cancerígenas do cancro da próstata, 95%) ligada ao fator estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (molécula que ativa as células imunitárias). Quando em contacto com a proteína conjugada, as APCs vão internalizá-la, processá-la e expressá-la através do MHC. Após a exposição e estimulação das APCs extraídas, estas são reintroduzidas no indivíduo, onde irão interagir com as restantes células imunitárias, desencadeando assim, uma resposta imunitária contra as células malignas (figura 8) (Anassi & Ndefo, 2011; Mantegazza et al., 2013).

Atualmente, a Sipuleucel-T (Provenge®) encontra-se revogada (*European Medicines Agency*, 2013).



**Figura 8:** Apresentação do neo-antígeno pelas APCs às células T do hospedeiro (adaptado de Messerschmidt et al., 2016).

Em 2013 foi introduzida, pela primeira vez em ensaios clínicos, a vacinação personalizada com ARNm (ácido ribonucleico mensageiro) proveniente de células cancerígenas (ainda em desenvolvimento) (Diken et al., 2015).

A grande diferença deste tipo de vacinação em comparação com a Sipuleucel-T baseia-se na origem dos neo-antígenos utilizados. De facto, nas vacinas personalizadas com moléculas de ARN (ácido ribonucleico), as moléculas que irão estimular as células do sistema imunitário são obtidas através da sequenciação do genoma das células tumorais existente no indivíduo. O que torna a utilização de vacinas de ARN tão atraente é o facto destas permitem a administração de grandes quantidades de antígenos específicos, no indivíduo portador do tumor, e de serem aplicáveis a qualquer tipo de cancro que transporte mais do que uma mutação. No entanto, ainda existem muitos desafios a ser ultrapassados até que se consiga realmente utilizar este tipo de vacinas na prática clínica (Pollard, Koker, Saelens, Vanham & Grooten, 2013; Diken et al., 2015; McNamara, Nair & Holl, 2015).

### 3.2.1- Evidências Científicas

Para além das evidências já demonstradas no cancro da próstata, do melanoma e do CPCNP, estão atualmente a explorar-se novas áreas de aplicação deste tipo de imunoterapia. Atualmente existem vários ensaios clínicos a decorrer onde se estudam a

eficácia e possíveis aplicações deste tipo de terapêutica (Kantoff et al., 2010; Anassi & Ndefo, 2011; Brunsvig et al., 2011; Castle et al., 2012; Carreno et al., 2015).

Através da NGS, o desenho e personalização de vacinas no combate ao cancro é agora mais fácil. Uma vez que a NGS permite a sequenciação do genoma das células malignas, é possível determinar as mutações que nele existem face ao genoma das células saudáveis e assim, seleccionar aquelas que poderão dar origem a neo-antígenos e a uma potente resposta imune (Castle et al., 2012).

### 3.2.2-Efeitos Adversos e Limitações

A maioria dos efeitos adversos que surgem com este tipo de imunoterapia devem-se à infusão do conteúdo da vacina. No entanto, a administração de paracetamol ou mesmo de um anti-histamínico, como é o caso da difenidramina (anti-histamínico H1), ajudam a suportar esses efeitos (febre, náuseas, fadiga, entre outros) (tabela 2 em anexo) (Resumo das Características, 2013; Anassi & Ndefo, 2011).

Pode-se considerar que uma das maiores limitações deste tipo de terapêuticas é o seu custo económico. Efetivamente, a Sipuleucel-T, apesar de apresentar um benefício clínico superior ao docetaxel (agente de quimioterapia utilizado no tratamento padrão do cancro da próstata), é significativamente mais caro (Anassi & Ndefo, 2011).

### **3.3- Transferência Celular Adotiva**

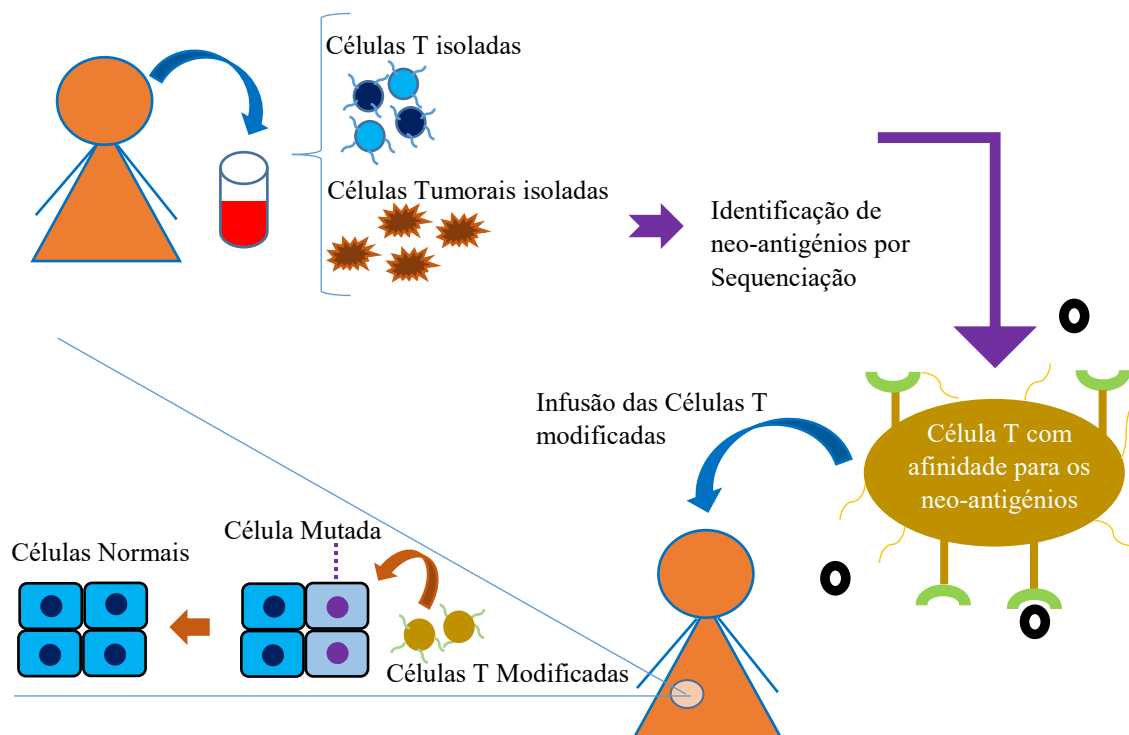
A transferência de células adotivas consiste na administração de células imunitárias do hospedeiro, após a sua estimulação contra um determinado neo-antígeno (Rosenberg & Restifo, 2015).

Neste tipo de imunoterapia as células T do indivíduo são cultivadas, ativadas e seleccionadas *in vitro*, ou modificadas geneticamente, sendo posteriormente administradas no hospedeiro do tumor. Devido à capacidade que as células imunitárias têm de reconhecer as células malignas e de se expandir mais de mil vezes no organismo, este tipo de imunoterapia tem alcançado, em ensaios clínicos, resultados muito promissores. Exemplo disso são os resultados obtidos no melanoma, em leucemias e mesmo no cancro da próstata. No entanto, ainda é necessário otimizar alguns aspetos neste tipo de terapêutica (Ilumina, s.d.a; Perica, Varela, Oelke & Schneck, 2015).

A ACT subdivide-se em 2 tipos: ACT com células T geneticamente modificadas e ACT de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) (Ilumina, s.d.a).

### 3.3.1- Células T

Na ACT com células T, os linfócitos são modificados fora do organismo humano, após a sua colheita a partir do indivíduo com cancro. Através da sua modificação, os linfócitos T passam a expressar um recetor de antígeno quimérico (CAR) que é composto por um domínio de ligação ao anticorpo e domínios que ativam as células T. Ao serem reintroduzidas no indivíduo, estas células vão desencadear uma resposta dirigida ao tumor, promovendo a sua eliminação (figura 9) (Ilumina, s.d.a; Morrison, 2015).



**Figura 9:** Transferência Celular Adotiva de células T (adaptado de Ilumina, s.d.a). -A partir do indivíduo portador do tumor isolam-se células imunitárias e células tumorais. Após o seccionamento dos neo-antígenos, as células T são modificadas geneticamente. Uma vez reintroduzidas no hospedeiro do tumor desencadeiam um conjunto de ações que irão promover a eliminação das células tumorais.

Este tipo de ACT tem alcançado resultados clínicos muito positivos (expansão de mil vezes de células-T CAR após administração), com expressão CAR persistente e a geração de células imunológicas de memória (Ilumina, s.d.a).

Num estudo realizado por Kalos et al. (2011), em indivíduos com leucemia linfocítica crónica resistente a quimioterapia (LLC), foram colhidas células T de cada um dos indivíduos (3 indivíduos), que posteriormente foram manipuladas para que expressassem um domínio CAR anti-CD19 (*cluster of differentiation 19*). Após seleção

e purificação das células T modificadas, estas foram reintroduzidas nos indivíduos de onde foram isoladas. Uma vez no organismo, estas células começaram a expandir-se, adquirindo uma forte resposta imunológica anti-tumoral que se manteve por mais de 6 meses. Através de dados imunológicos obtidos, verificou-se que a resposta anti-tumoral era específica para o CD19, tendo mesmo em dois dos indivíduos ocorrido a remissão completa do tumor. Para além destes excelentes resultados, também foram detetadas células de memória anti-CD19 funcionais (Kalos et al., 2011).

Outros estudos envolvendo a aplicação desta terapêutica em LLC resistente a quimioterapia ou leucemia linfocítica aguda, têm sido elaborados com resultados muito promissores. Foram mesmo explorados os mecanismos que levavam à reincidência da doença, após a utilização da ACT. Verificou-se que as recidivas se deviam ou à perda do CAR (deixava de ser expresso, devido a deleções por exemplo), ou a uma alteração na sua expressão, que levava à perda de atividade (Grupp et al., 2013; Sotillo et al., 2015).

### 3.3.2- Linfócitos Infiltrantes de Tumor (TILs)

Sabe-se hoje, que os linfócitos infiltrantes de tumor, presentes no microbioma tumoral, têm a capacidade de reconhecer e marcar como alvo “produtos” resultantes de mutações tumorais. Na década de 1980, demonstrou-se que este tipo de ACT apresentava a capacidade de promover a regressão tumoral em alguns tipos de cancro (Ilumina, s.d.a; Rosenberg & Restifo, 2015).

Na ACT de TILs, as células T que são extraídas do indivíduo com o tumor não sofrem qualquer tipo de manipulação genética. Estas, após serem isoladas, a partir do tecido tumoral, são cultivadas. Uma vez em cultura a sua proliferação é estimulada, sendo no fim selecionados os TILs capazes de reconhecer e eliminar as células malignas. Após a sua purificação as células imunes são reintroduzidas novamente no indivíduo (Ilumina, s.d.a; Vadali, 2016).

Os resultados obtidos inicialmente com este tipo de terapêutica não foram muito motivadores. Estes resultados deveram-se ao facto das células serem rapidamente eliminadas após a sua administração no organismo, apresentando assim uma duração de ação muito curta. Contudo, em 2012, observou-se que, através da administração de um regime de quimioterapia mieloablativa (quimioterapia de doses elevadas capaz de destruir, para além das células malignas, células da medula óssea) antes da ACT, conseguia-se obter resultados mais otimistas com esta terapêutica. Assim, os TILs

compostos geralmente por células T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> conseguiram promover a regressão do tumor (Rosenberg & Restifo, 2015).

Também neste tipo de imunoterapia, a NGS desempenhou um papel muito importante. Efetivamente, foi graças aos seus contributos que se verificou que os TILs tinham a capacidade de reconhecer e marcar como alvo moléculas sintetizadas pelas células tumorais (Illumina, s.d.a; Rosenberg & Restifo, 2015).

Foi no melanoma que se obtiveram os melhores resultados através da aplicação deste tipo de ACT. De facto, esta é a maneira mais eficaz de tratamento do melanoma metastático. Todavia, atualmente já são inúmeras as provas que demonstram que através da ACT se consegue regredir o crescimento tumoral, não só no melanoma como também noutra tipo de tumores (Illumina, s.d.a; Perica et al., 2015; Rosenberg & Restifo, 2015).

### 3.3.3- Vantagens

Apesar de ainda existirem vários pontos a melhorar, esta terapêutica apresenta inúmeras vantagens. Exemplo disso é a capacidade de manipulação das células T, que permite direcionar de forma específica a resposta das células imunes contra um determinado neo-antígeno; a facilidade que as células imunitárias apresentam, de uma vez introduzidas no organismo, se expandir; e o facto de não ser necessário recolher grandes quantidades de amostra (de populações celulares) (Rosenberg, Restifo, Yang, Morgan & Dudley, 2008; Morrison, 2015).

### 3.3.4- Evidências Científicas

São vários os estudos que demonstram que o uso da ACT no melanoma metastático consegue alcançar não só a regressão tumoral, como também, uma resposta duradoura ao longo do tempo (Rosenberg et al., 2008, 2011; Radvanyi et al., 2012).

Recentemente, num estudo realizado por Maus, Grupp, Porter & June (2014), obteve-se uma taxa de resposta com a ACT de cerca de 80%. Neste estudo, os investigadores analisaram o efeito que as células T modificadas (que expressavam um recetor CAR capaz de reconhecer o marcador CD19 existente nos linfócitos B) tinham sobre a leucemia linfóide aguda (Maus, Grupp, Porter & June, 2014).

Um outro estudo realizado por Stevanović et al. (2014), demonstrou que a ACT conseguiu conduzir à remissão completa das células malignas em indivíduos portadores de cancro do colo do útero metastático, sendo a resposta também ela duradoura (Stevanović et al., 2015).

Estes e muitos outros estudos, não só, demonstram o potencial que a ACT possui, como também evidenciam o papel que a NGS teve no avanço desta aplicação de imunoterapia (Illumina, s.d.a).

### 3.3.5- Transferência celular Adotiva - Novas Vertentes

A ACT é uma terapêutica que se tem revelado muito promissora, sendo uma imunoterapia clínica emergente no tratamento de cancro (Wang, Yin, Wang & Wang, 2014; Perica et al., 2015)

Atualmente estão em desenvolvimento novas vertentes da ACT. Exemplo disso são as células T manipuladas através de métodos de engenharia genética, que transformam estas células em veículos transportadores de agentes terapêuticos. Desta forma, o papel das células T no combate ao cancro e a própria eliminação das células tumorais é mais eficiente (Tsai & Davila, 2016).

Nesta nova vertente da ACT, não só as células T, como também outras células têm sido estudadas como potenciais veículos de agentes terapêuticos. Células-tronco mesenquimais (MSCs), macrófagos, neutrófilos e células da microglia, têm já servido de molde em inúmeros estudos. Contudo, os resultados obtidos foram desanimadores ou os desafios que foram surgindo ao longo do processo limitaram a utilização destas células. A utilização das células como veículos tem como objetivo limitar a área de contacto das substâncias transportadas. Desta forma, consegue-se aumentar a eficácia da terapêutica e a biodisponibilidade do composto, uma vez que se conseguem evitar os processos de metabolização dos mesmos. Ao mesmo tempo consegue-se ainda limitar o contacto da molécula transportada com os tecidos saudáveis, diminuindo, assim, a toxicidade e a quantidade de agente terapêutico a utilizar. Efetivamente, a maioria dos tratamentos sistémicos convencionais, ao não atuarem de forma específica, exercem a sua ação não só sobre os tecidos malignos como também sobre os tecidos saudáveis, levando a que a dose muitas vezes seja inferior à eficaz e/ou a que se desenvolva toxicidade. No entanto, as células T devido à sua capacidade de direcionar de forma específica a sua atividade, exercendo a sua ação apenas nas células que expressam o antigénio para o qual foram estimuladas, conseguem contornar estes aspetos negativos. Desta forma, estas células, devido à sua especificidade acabam por ser ideais no tratamento de cancros metastizados (Zinkernagel, 2002; Rahir & Moser, 2012; Mantegazza et al., 2013; Tsai & Davila, 2016).

Para além da especificidade, as células imunitárias têm ainda a capacidade de penetrar nos tumores sólidos, o que está associado a um prognóstico positivo (Sparmann & Bar-Sagi, 2004; Faria & Rabenhorst, 2006; Rahir & Moser, 2012).

A penetração tumoral e a habilidade que as células T têm de alcançar praticamente qualquer parte do organismo, como é o caso da barreira hematoencefálica (BHE), permite a estas células funcionarem como bons veículos de agentes terapêuticos, assim como, alcançar e tratar tumores que de outra forma não se conseguiriam tratar ou seriam muito difíceis de alcançar (Carson, Doose, Melchior, Schmid & Ploix, 2006; Cose, 2007; Engelhardt & Ransohoff, 2012).

Atualmente existem estudos em desenvolvimento que tentam tornar a secreção mediada pelas células T mais refinada. O seu objetivo consiste em promover a libertação das substâncias transportadas apenas quando ocorrer a interação específica com as células tumorais. Assim, ao se garantir que o agente terapêutico transportado apenas irá atuar no tumor e ao seu redor, a seleção das moléculas a utilizar acaba por ser muito mais vasta. Algumas das moléculas estudadas envolvem anticorpos, citocinas (IL2) e quimiocinas (Tsai & Davila, 2016).

A Il-12 tem a capacidade de aumentar a atividade e a função das células T. No entanto, esta citocina pro-inflamatória quando administrada sistemicamente é excessivamente tóxica, podendo mesmo causar trombocitopenia, leucopenia, e hiperbilirrubinemia dose-dependente. Contudo, estes efeitos facilmente conseguem ser contornados. Se a sua administração ocorrer de forma localizada, isto é, apenas ao nível do tumor, para além de se obter o efeito clínico pretendido, os efeitos adversos facilmente são tolerados. Esta descoberta serviu de base para o desenvolvimento de uma estratégia que permitisse o seu uso associado às células T. Num modelo de rato com melanoma, a administração deste tipo de terapêutica resultou num aumento significativo de células T ativadas contra o cancro e numa baixa toxicidade (Tsai & Davila, 2016).

### 3.3.6- Limitações

Qualquer que seja a vertente da ACT existem sempre riscos e desafios a ser ultrapassados (Rosenberg et al., 2008). Tratando-se de um método altamente personalizado que exige a manipulação genética, este necessita de laboratórios, equipamentos específicos e de pessoal devidamente qualificado que garantam a qualidade do produto. Por outro lado, não sendo uma terapêutica *standard* (um dos fatores que torna a sua utilização tão atraente), o seu uso na prática clínica acaba por não estar muito facilitado. Devido aos fatores que envolvem a sua produção (rentabilidade e reprodutibilidade) as próprias indústrias acabam por não investir muito nesta área (Rosenberg et al., 2008; Kalos & June, 2013).

## **Capítulo V- Conclusão**

Até há algum tempo, as bases do tratamento do cancro centravam-se na quimioterapia, radioterapia e cirurgia. No entanto, através dos resultados recentemente alcançados na imunoterapia, esta acabou também por se juntar aos restantes métodos de tratamento oncológico (Perica et al., 2015).

São vários os fatores que tornam a imunoterapia apelativa no tratamento das neoplasias. É o caso da especificidade do sistema imunitário, da sua capacidade de expansão, ativação e de memória (Perica et al., 2015)

Apesar do papel ambíguo que o sistema imunitário apresenta no cancro, este tem a capacidade de detetar e eliminar as células malignas (Balkwill et al., 2012).

A imunoterapia, ao contrário das outras terapêuticas, não desempenha uma ação direta contra o cancro. A base deste tipo de tratamento consiste na estimulação/ativação do sistema imunitário contra um neo-antígeno específico do tumor, ou na inibição de vias que são usualmente utilizadas pelas células malignas na fuga à atividade imune. Independentemente do método utilizado, são já inúmeras as evidências que demonstram o quão eficaz e promissor é este tipo de tratamento (Messerschmidt et al., 2016).

Existem também vários estudos e ensaios clínicos onde se usam terapêuticas combinadas. Nestes estudos, a combinação de terapêuticas obteve uma maior eficácia na eliminação das células malignas, do que a imunoterapia isolada (Ilumina, s.d.a).

Grande parte dos avanços alcançados na terapêutica imunológica devem-se à NGS. Esta foi sem sombra de dúvida um dos maiores avanços dos últimos tempos. No entanto, devido à complexidade que envolve o sistema imunitário e o desenvolvimento tumoral, ainda existe um longo caminho a percorrer (Ilumina, s.d.a).

No futuro, para além da utilização de terapêuticas personalizadas, talvez se consigam produzir e elaborar métodos de rastreio que permitam selecionar, a partir das características intrínsecas do indivíduo e do tumor, a terapêutica ideal para cada indivíduo. De facto, as diferenças genéticas que existem dentro de uma população de indivíduos, os fatores ambientais a que cada um deles se encontra exposto, as características do microbioma e do microambiente tumoral, têm a capacidade de influenciar o sistema imunitário, e como tal, o próprio combate ao cancro (Ilumina, s.d.a; (Tsai & Davila, 2016).

Em suma, devido ao enorme potencial que o sistema imunitário apresenta, através do aperfeiçoamento das terapêuticas atuais aliado a um maior conhecimento técnico-

científico, é certo que nas próximas décadas, o tratamento do cancro irá entrar uma Nova Era.

## Capítulo VI- Bibliografia

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). *Imunologia Celular e Molecular*. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier. [Consultado a 26 de Junho de 2016]. Disponível em: [https://books.google.pt/books?id=n2HuCgAAQBAJ&pg=PA393&lpg=PA393&dq=linf](https://books.google.pt/books?id=n2HuCgAAQBAJ&pg=PA393&lpg=PA393&dq=linf%C3%B3citos+t+e+DP-)

[1&source=bl&ots=gtFK3axoRa&sig=pRT2YZRY4tEXy1B8iWiz6jCBMbk&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwj3w9qfifDKAhUCWhQKHYzDAeIQ6AEILjAD#v=onepage&q=ctla-&f=false](https://books.google.pt/books?id=n2HuCgAAQBAJ&pg=PA393&lpg=PA393&dq=linf%C3%B3citos+t+e+DP-1&source=bl&ots=gtFK3axoRa&sig=pRT2YZRY4tEXy1B8iWiz6jCBMbk&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwj3w9qfifDKAhUCWhQKHYzDAeIQ6AEILjAD#v=onepage&q=ctla-&f=false)

Acharya, U. H., & Jeter, J. M. (2013). Use of ipilimumab in the treatment of melanoma. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, 5(1), 21–27. doi:10.2147/CPAA.S45884

Aggarwal, B. B., Vijayalekshmi, R. V., & Sung, B. (2009). Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clinical Cancer Research*, 15(2), 425-430. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0149

American Association for Cancer Research. (2016). Nods for atezolizumab and nivolumab from FDA. *Cancer Discovery*, 6(8), 811-811. doi:10.1158/2159-8290.CD-NB2016-080

American Cancer Society. (2015). *Cancer Facts & Figures 2015*. [Consultado a 29 de Março de 2016], Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acspc-044552.pdf>

Ammirante, M., Luo, J.-L., Grivennikov, S., Nedospasov, S., & Karin, M. (2010). B cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer. *Nature*, 464(7286), 302–305. doi:10.1038/nature08782

Anassi, E., & Ndefo, U. A. (2011). sipuleucel-T (provenge) injection: the first immunotherapy agent (vaccine) for hormone-refractory prostate cancer. *Pharmacy and*

*Therapeutics*, 36(4), 197–202. [Consultado a 6 de Agosto de 2016]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3086121/>

Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Criollo, A., Ortiz, C., Lidereau, R., ... Zitvogel, L. (2007a). The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunological Reviews*, 220(1), 47-59. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00573.x

Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., ... Zitvogel, L. (2007b). Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature Medicine*, 13(9), 1050-1059. doi:10.1038/nm1622

Balkwill, F. R., Capasso, M., & Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *J Journal of Cell Science*, 125(23), 5591-5596. doi:10.1242/jcs.116392

Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing?. *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition*, 98(6), 236–238. doi:10.1136/archdischild-2013-304340

Bertrand, A., Kostine, M., Barnetche, T., Truchetet, M. E., & Schaefferbeke, T. (2015). Immune related adverse events associated with anti-CTLA-4 antibodies: systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine*, 13(1), 1-14. doi:10.1186/s12916-015-0455-8

Bonecchi, R., Galliera, E., Borroni, E. M., Corsi, M. M., Locati, M., & Mantovani, A. (2008). Chemokines and chemokine receptors: an overview. *Frontiers in Bioscience*, 14, 540-551. doi:10.2741/3261

Brunsvig, P. F., Kyte, J. A., Kersten, C., Sundstrøm, S., Møller, M., Nyakas, M., ... Aamdal, S. (2011). Telomerase peptide vaccination in NSCLC: a phase II trial in stage III patients vaccinated after chemoradiotherapy and an 8-year update on a phase I/II trial. *Clinical Cancer Research*, 17(21), 6847-6857. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1385

Carreno, B. M., Magrini, V., Becker-Hapak, M., Kaabinejadian, S., Hundal, J., Petti, A. A., ... Linette, G. P. (2015). A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells. *Science*, *348*(6236), 803–808. doi:10.1126/science.aaa3828

Carson, M. J., Doose, J. M., Melchior, B., Schmid, C. D., & Ploix, C. C. (2006). CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunological Reviews*, *213*(1), 48–65. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00441.x

Caspi, R. R. (2008). Immunotherapy of autoimmunity and cancer: the penalty for success. *Nature Reviews Immunology*, *8*(12), 970–976. doi:10.1038/nri2438

Castle, J. C., Kreiter, S., Diekmann, J., Löwer, M., Roemer, N., Graaf, J., ... Sahin, U. (2012). Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Research*, *72*(5), 1081-1091. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3722

Chapman, M., Warren, E. H., & Wu, C. J. (2012). Applications of next generation sequencing to blood and marrow transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *18*(1), S151–S160. doi:10.1016/j.bbmt.2011.11.011

Chustecka, Z. (2016). Immunotherapy is ASCO's advance of the year. *Medscape*. [Consultado a 2 de Maio de 2016]. Disponível em: [http://www.medscape.com/viewarticle/858264#vp\\_2](http://www.medscape.com/viewarticle/858264#vp_2)

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. doi:10.1093/carcin/bgp127

Cose, S. (2007). T-cell migration: a naive paradigm?. *Immunology*, *120*(1), 1–7. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02511.x

Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., ... White, E. (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*, *10*(1), 51–64. doi:10.1016/j.ccr.2006.06.001

Diken, M., Kreiter, S., Kloke, B., & Sahin, U. (2015). Current developments in actively personalized cancer vaccination with a focus on RNA as the drug format. *Progress in Tumor Research*, 42, 44-54 doi:10.1159/000437184

Direção-Geral da Saúde (DGS) (2014). *PORTUGAL Doenças Oncológicas em Números – 2014: Programa Nacional para as Doenças Oncológicas*. [Consultado a 15 de Março de 2016], Disponível em: <https://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjC0IqT2aPPAhWBXhoKHYeuCg8QFggdMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.dgs.pt%2Festatisticas-de-saude%2Festatisticas-de-saude%2Fpublicacoes%2Fportugal-doencas-oncologicas-em-numeros-2014-pdf.aspx&usg=AFQjCNHzGMs3exhN2IZVtx7Jl61BPNINPA>

Direção-Geral da Saúde (DGS) (2015). *A Saúde dos Portugueses. Perspetiva 2015*. [Consultado a 21 de Março de 2016], Disponível em: <https://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjL-Nfg2aPPAhWDcRQKHcD8CzsQFggdMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.dgs.pt%2Festatisticas-de-saude%2Festatisticas-de-saude%2Fpublicacoes%2Fa-saude-dos-portugueses-perspetiva-2015-pdf.aspx&usg=AFQjCNFvxwA8vyr7fCQnBiGRvR9n50782A>

Direção-Geral da Saúde (DGS) (2016). *PORTUGAL Doenças Oncológicas em Números – 2015: Programa Nacional para as Doenças Oncológicas*. . [Consultado a 1 de Setembro de 2016], Disponível em: [http://www.apah.pt/media/publicacoes\\_tecnicas\\_sector\\_saude\\_2/Doencas\\_Oncologicas.pdf](http://www.apah.pt/media/publicacoes_tecnicas_sector_saude_2/Doencas_Oncologicas.pdf)

Dostert, C., Pétrilli, V., Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B. T., & Tschopp, J. (2008). Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*, 320(5876), 674-677. doi:10.1126/science.1156995

Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3(11), 991-998. doi:10.1038/ni1102-991

Engelhardt, B., & Ransohoff, R. M. (2012). Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood–brain barriers. *Trends in Immunology*, 33(12), 579-589. doi:10.1016/j.it.2012.07.004

European Medicines Agency (EMA). (2013). Provenge: células mononucleares autólogas de sangue periférico ativadas com PAP-GMCSF (sipuleucel-T). [Consultado a 1 de Agosto de 2016]. Disponível em: [http://www.ema.europa.eu/docs/pt\\_PT/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/002513/WC500151157.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002513/WC500151157.pdf)

Faria, M. H. G., & Rabenhorst, S. H. B. (2006). Impacto do oncogene C-MYC no câncer. *Revista Brasileira De Cancerologia*, 52(2), 165–171. [Consultado a 14 de Junho de 2016]. Disponível em: [http://www1.inca.gov.br/rbc/n\\_52/v02/pdf/revisao2.pdf](http://www1.inca.gov.br/rbc/n_52/v02/pdf/revisao2.pdf)

Forget, P., Simonet, O., & Kock, M. (2013). Cancer surgery induces inflammation, immunosuppression and neo-angiogenesis, but is it influenced by analgesics?. *F1000Research*, 2, 102. doi:10.12688/f1000research.2-102.v1

Gao, S. P., Mark, K. G., Leslie, K., Pao, W., Motoi, N., Gerald, W. L., ... Bromberg, J. F. (2007). Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(12), 3846-3856. doi:10.1172/JCI31871

Gelao, L., Criscitiello, C., Esposito, A., Goldhirsch, A., & Curigliano, G. (2014). Immune checkpoint blockade in cancer treatment: a double-edged sword cross-targeting the host as an “innocent bystander.” *Toxins*, 6(3), 914–933. doi:10.3390/toxins6030914

Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., ... Zitvogel, L. (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 $\beta$ –

dependent adaptive immunity against tumors. *Nature Medicine*, 15(10), 1170-1178. doi:10.1038/nm.2028

Gierach, G. L., Lacey, J. V., Schatzkin, A., Leitzmann, M. F., Richesson, D., Hollenbeck, A. R., & Brinton, L. A. (2008). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer risk in the National Institutes of Health–AARP Diet and Health Study. *Breast Cancer Research*, 10(2), 1-13. doi:10.1186/bcr2089

Greaves, P., & Gribben, J. G. (2013). The role of B7 family molecules in hematologic malignancy. *Blood*, 121(5), 734-744. doi:10.1182/blood-2012-10-385591

Greten, F. R., Eckmann, L., Greten, T. F., Park, J. M., Li, Z., Egan, L. J., ... Karin, M. (2004). IKK $\beta$  links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*, 118(3), 285-296. doi:10.1016/j.cell.2004.07.013

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, 140(6), 883–899. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025

Grupp, S. A., Kalos, M., Barrett, D., Aplenc, R., Porter, D. L., Rheingold, S. R., ... June, C. H. (2013). Chimeric antigen receptor–modified T cells for acute lymphoid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 368(16), 1509–1518. doi:10.1056/NEJMoa1215134

Hammerstrom, A. E., Cauley, D. H., Atkinson, B. J., & Sharma, P. (2011). Cancer immunotherapy: sipuleucel-T and beyond. *Pharmacotherapy*, 31(8), 813–828. doi:10.1592/phco.31.8.813

He, X., Qian, Y., Li, Z., Fan, E. K., Li, Y., Wu, L., ... Fan, J. (2016). TLR4-upregulated IL-1 $\beta$  and IL-1RI promote alveolar macrophage pyroptosis and lung inflammation through an autocrine mechanism. *Scientific Reports*, 6, 31663. doi:10.1038/srep31663

Hussain, S. P., Hofseth, L. J., & Harris, C. C. (2003). Radical causes of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(4), 276-285. doi:10.1038/nrc1046

Ilumina. (s.d.a). Immunotherapy, the next generation of cancer treatment. [Consultado a 22 de Abril de 2016]. Disponível em: <http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appspotlights/ngs-immuno-oncology-application-spotlight-1170-2016-005.pdf>

Ilumina (s.d.b). Immuno-oncology informatic applications using next-generation sequencing. [Consultado a 6 de Abril de 2016]. Disponível em: <http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/ngs-immuno-oncology-tech-note-1170-2016-013.pdf>

Jessy, T. (2011). Immunity over inability: the spontaneous regression of cancer. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 2(1), 43-49. doi:10.4103/0976-9668.82318

Joyce, J. A., & Pollard, J. W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 9(4), 239–252. doi:10.1038/nrc2618

Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420–1428. doi:10.1172/JCI39104

Kalos, M., & June, C. H. (2013). Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology. *Immunity*, 39(1), 49-60. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.002

Kalos, M., Levine, B. L., Porter, D. L., Katz, S., Grupp, S. A., Bagg, A., & June, C. H. (2011). T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Science Translational Medicine*, 3(95), 95ra73. doi:10.1126/scitranslmed.3002842

Kantoff, P. W., Schuetz, T. J., Blumenstein, B. A., Glode, L. M., Bilhartz, D. L., Wyand, M., ... Godfrey, W. R. (2010). Overall survival analysis of a phase II randomized controlled trial of a Poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(7), 1099–1105. doi:10.1200/JCO.2009.25.0597

Karin, M. (2006). Nuclear factor- $\kappa$ B in cancer development and progression. *Nature*, 441(7092), 431-436. doi:10.1038/nature04870

Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., & Li, Z. W. (2002). NF- $\kappa$ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature Reviews Cancer*, 2(4), 301-310. doi:10.1038/nrc780

Le, D. T., Uram, J. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Kemberling, H., Eyring, A. D., ... Diaz, L. A. (2015). PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *The New England Journal of Medicine*, 372(26), 2509-2520. doi:10.1056/NEJMoa1500596

Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121(1), 1–14. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x

Kim, S., Takahashi, H., Lin, W. W., Descargues, P., Grivennikov, S., Kim, Y., ... Karin, M. (2009). Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature*, 457(7225), 102-106. doi: 10.1038/nature07623

Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M., & Hogquist, K. A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nature Reviews Immunology*, 14(6), 377-391. doi:10.1038/nri3667

Kujawski, M., Kortylewski, M., Lee, H., Herrmann, A., Kay, H., & Yu, H. (2008). Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(10), 3367-3377. doi:10.1172/JCI35213

Lin, W. W., & Karin, M. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1175-1183. doi:10.1172/JCI31537

Liu, X., Plummer, S. J., Nock, N. L., Casey, G., & Witte, J. S. (2006). Nonsteroidal antiinflammatory drugs and decreased risk of advanced prostate cancer: modification by lymphotoxin alpha. *American Journal of Epidemiology*, 164(10), 984-989. doi:10.1093/aje/kwj294

Maeda, S., Kamata, H., Luo, J. L., Leffert, H., & Karin, M. (2005). IKK $\beta$  couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell*, *121*(7), 977-990. doi:10.1016/j.cell.2005.04.014

Male, D., Brostoff, J., Roth, D. B., & Roitt, I. M. (2014). *Imunologia*. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier. [Consultado a 16 de Abril de 2016]. Disponível em: <https://books.google.pt/books?id=8Nt2BgAAQBAJ&pg=PA152&lpg=PA152&dq=ligando+B7&source=bl&ots=CaadvK03hp&sig=YZg279WU7Dt-Zr9rg5Wik2spO5A&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwjf3NrGgKDNAhUGPxoKHbaICgEQ6AEIOzAE#v=onepage&q=ligando%20B7&f=false>

Mantegazza, A. R., Magalhaes, J. G., Amigorena, S., & Marks, M. S. (2013). Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic*, *14*(2), 135–152. doi:10.1111/tra.12026

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, *454*(7203), 436-444. doi:10.1038/nature07205

Markham, A. (2016). Atezolizumab: first global approval. *Drugs*, *76*(12), 1227-1232. doi:10.1007/s40265-016-0618-8

Martin-Orozco, N., Muranski, P., Chung, Y., Yang, X. O., Yamazaki, T., Lu, S., ... Dong, C. (2009). Th17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity*, *31*(5), 787–798. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.014

Martin, S. D., Coukos, G., Holt, R. A., & Nelson, B. H. (2015). Targeting the undruggable: Immunotherapy meets personalized oncology in the genomic era. *Annals of Oncology*, *26*(12), 2367–2374. doi:10.1093/annonc/mdv382

Massagué, J. (2008). TGF $\beta$  in cancer. *Cell*, *134*(2), 215–230. doi:10.1016/j.cell.2008.07.001

Maus, M. V., Grupp, S. A., Porter, D. L., & June, C. H. (2014). Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood*, *123*(17), 2625–2635. doi:10.1182/blood-2013-11-492231

McDonnell, A. M., Robinson, B. W., & Currie, A. J. (2010). Tumor antigen cross-presentation and the dendritic cell: where it all begins?. *Clinical and Developmental Immunology*, *2010*, 1-9. doi:10.1155/2010/539519

McNamara, M. A., Nair, S. K., & Holl, E. K. (2015). RNA-based vaccines in cancer immunotherapy. *Journal of Immunology Research*, *2015*, 1-9. doi:10.1155/2015/794528

Meira, L. B., Bugni, J. M., Green, S. L., Lee, C. W., Pang, B., Borenshtein, D., ... Samson, L. D. (2008). DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(7), 2516-2525. doi:10.1172/JCI35073

Messerschmidt, J. L., Prendergast, G. C., & Messerschmidt, G. L. (2016). How cancers escape immune destruction and mechanisms of action for the new significantly active immune therapies: helping nonimmunologists decipher recent advances. *The Oncologist*, *21*(2), 233–243. doi:10.1634/theoncologist.2015-0282

Moon, Y. W., Hajjar, J., Hwu, P., & Naing, A. (2015). Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, *3*(1), 1-10. doi:10.1186/s40425-015-0094-9

Moran, A. E., & Hogquist, K. A. (2012). T-cell receptor affinity in thymic development. *Immunology*, *135*(4), 261–267. doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03547.x

Morrison, C. (2015). CAR-T field booms as next-generation platforms attract big players. *Nature Biotechnology*, *33*(6), 571-572. doi:10.1038/nbt0615-571

Mullane, S. A., & Bellmunt, J. (2016). Cancer immunotherapy: new applications in urologic oncology. *Current Opinion in Urology*. doi:10.1097/MOU.0000000000000337

Nickoloff, B. J., Ben-Neriah, Y., & Pikarsky, E. (2005). Inflammation and cancer: is the link as simple as we think?. *Journal of Investigative Dermatology*, *124*(6), x-xiv. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23724.x

Palmer, E. D., & Naeher, D. (2009). Affinity threshold for thymic selection through a T-cell receptor–co-receptor zipper. *Nature Reviews Immunology*, *9*(3), 207-213. doi:10.1038/nri2469

Patrick, M., Pfaller, M., & Kem, P. R. (2014). *Microbiologia Médica*. 7ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier. [Consultado a 22 de Julho de 2016]. Disponível em: [https://books.google.pt/books?id=dDgcBgAAQBAJ&pg=PA70&lpg=PA70&dq=ligando+b7+das+APCs+o+que+%C3%A9&source=bl&ots=6yys3G2YVn&sig=qRCEcnA\\_DKRAz6\\_0mPfdKB8TGwg&#v=onepage&q=ligando%20b7%20das%20APCs%20o%20que%20%C3%A9&f=false](https://books.google.pt/books?id=dDgcBgAAQBAJ&pg=PA70&lpg=PA70&dq=ligando+b7+das+APCs+o+que+%C3%A9&source=bl&ots=6yys3G2YVn&sig=qRCEcnA_DKRAz6_0mPfdKB8TGwg&#v=onepage&q=ligando%20b7%20das%20APCs%20o%20que%20%C3%A9&f=false)

Perica, K., Varela, J. C., Oelke, M., & Schneck, J. (2015). Adoptive T cell immunotherapy for cancer. *Rambam Maimonides Medical Journal*, *6*(1), e0004. doi:10.5041/RMMJ.10179

Platten, M., Doeberitz, N. K., Oezen, I., Wick, W., & Ochs, K. (2015). Cancer immunotherapy by targeting IDO1/TDO and their downstream effectors. *Frontiers in Immunology*, *5*, 673. doi:10.3389/fimmu.2014.00673

Pollard, C., Koker, S., Saelens, X., Vanham, G., & Grooten, J. (2013). Challenges and advances towards the rational design of mRNA vaccines. *Trends in Molecular Medicine*, *19*(12), 705-713. doi:10.1016/j.molmed.2013.09.002

Prendergast, G. C. (2011). Cancer: why tumours eat tryptophan. *Nature*, *478*(7368), 192-194. doi:10.1038/478192a

Punturieri, A., Szabo, E., Croxton, T. L., Shapiro, S. D., & Dubinett, S. M. (2009). Lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease: needs and opportunities for integrated research. *Journal of the National Cancer Institute*, *101*(8), 554-559. doi:10.1093/jnci/djp023

Quon, C., Xia, X., Smith, M., Drace, C., Mistry, A., Nielsen, A., ... & Towne, P. (2016, May). VENTANA anti-PD-L1 (SP263) rabbit monoclonal antibody: A high specificity and sensitivity anti-human PD-L1 antibody. *Journal of Clinical Oncology*, 34, e14509. [Consultado a 20 de Setembro de 2014] Disponível em: [http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/abstract/34/15\\_suppl/e14509](http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/abstract/34/15_suppl/e14509)

Radvanyi, L. G., Bernatchez, C., Zhang, M., Fox, P. S., Miller, P., Chacon, J., ... Hwu, P. (2012). Specific lymphocyte subsets predict response to adoptive cell therapy using expanded autologous tumor-infiltrating lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clinical Cancer Research*, 18(24), 6758–6770. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1177

Rahir, G., & Moser, M. (2012). Tumor microenvironment and lymphocyte infiltration. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(6), 751-759. doi:10.1007/s00262-012-1253-1

Rauf, A., Khatri, M., Murgia, M. V., & Saif, Y. M. (2012). Fas/FasL and perforin–granzyme pathways mediated T cell cytotoxic responses in infectious bursal disease virus infected chickens. *Results in Immunology*, 2, 112-119. doi:10.1016/j.rinim.2012.05.003

Redman, J. M., Gibney, G. T., & Atkins, M. B. (2016). Advances in immunotherapy for melanoma. *BMC Medicine*, 14(1), 1-11. doi:10.1186/s12916-016-0571-0

Resumo das Características do Medicamento KEYTRUDA. Aprovado em 30/07/2015b. Disponível na European Medicines Agency em: <http://www.ema.europa.eu>

Resumo das Características do Medicamento OPDIVO. Aprovado em 16/07/2015a. Disponível na European Medicines Agency em: <http://www.ema.europa.eu>

Resumo das Características do Medicamento Provenge. Aprovado em 03/10/2013. Disponível na European Medicines Agency em: <http://www.ema.europa.eu>

Resumo das Características do Medicamento YERVOY. Aprovado em 25/07/2011. Disponível na European Medicines Agency em: <http://www.ema.europa.eu>

Ricci, S. B., & Cerchiari, U. (2010). Spontaneous regression of malignant tumors: importance of the immune system and other factors (Review). *Oncology Letters*, 1(6), 941–945. doi:10.3892/ol.2010.176

Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A. S., Nizet, V., ... Karin, M. (2008). NF- $\kappa$ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 $\alpha$ . *Nature*, 453(7196), 807–811. doi:10.1038/nature06905

Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (2015). Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*, 348(6230), 62-68. doi:10.1126/science.aaa4967

Rosenberg, S. A., Restifo, N. P., Yang, J. C., Morgan, R. A., & Dudley, M. E. (2008). Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 8(4), 299-308. doi:10.1038/nrc2355

Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., Kammula, U. S., Hughes, M. 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. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0116

Sakurai, T., He, G., Matsuzawa, A., Yu, G. Y., Maeda, S., Hardiman, G., & Karin, M. (2008). Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 $\alpha$  release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis. *Cancer Cell*, 14(2), 156-165. doi:10.1016/j.ccr.2008.06.016

Schats, K. A., Vré, E. A., Schepper, S., Boeckx, C., Schrijvers, D. M., Waelput, W., ... Kockx, M. M. (2016). Validated PD-L1 immunohistochemistry assays (E1L3N & SP142) reveal similar immune cell staining patterns in melanoma when using the same sensitive detection system. *Histopathology*. doi:10.1111/his.13056

Schaue, D., Micewicz, E. D., Ratikan, J. A., Xie, M. W., Cheng, G., & McBride, W. H. (2015). Radiation and inflammation. *Seminars in Radiation Oncology*, 25(1), 4–10. doi:10.1016/j.semradonc.2014.07.007

Segerstrom, S. C., & Miller, G. E. (2004). Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychological Bulletin*, 130(4), 601–630. doi:10.1037/0033-2909.130.4.601

Sharma, P., & Allison, J. P. (2015a). Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell*, 161(2), 205-214. doi:10.1016/j.cell.2015.03.030

Sharma, P., & Allison, J. P. (2015b). The future of immune checkpoint therapy. *Science*, 348(6230), 56-61. doi:10.1126/science.aaa8172

Sharpe, A. H., & Abbas, A. K. (2006). T-cell costimulation—biology, therapeutic potential, and challenges. *The New England Journal of Medicine*, 355(10), 973-975. doi:10.1056/NEJMp068087

Sivan, A., Corrales, L., Hubert, N., Williams, J. B., Aquino-Michaels, K., Earley, Z. M., ... Gajewski, T. F. (2015). Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*, 350(6264), 1084–1089. doi:10.1126/science.aac4255

Smith, J., Robida, M. D., Acosta, K., Vennapusa, B., Mistry, A., Martin, G., ... Hnatyszyn, H. J. (2016). Quantitative and qualitative characterization of Two PD-L1 clones: SP263 and E1L3N. *Diagnostic Pathology*, 11(1), 44. doi:10.1186/s13000-016-0494-2

Smyth, M. J., Dunn, G. P., & Schreiber, R. D. (2006). Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Advances in Immunology*, 90, 1-50. doi:10.1016/S0065-2776(06)90001-7

Snyder, A., Makarov, V., Merghoub, T., Yuan, J., Zaretsky, J. M., Desrichard, A., ... Chan, T. A. (2014). Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 371(23), 2189–2199. doi:10.1056/NEJMoa1406498

Sotillo, E., Barrett, D. M., Black, K. L., Bagashev, A., Oldridge, D., Wu, G., ... Thomas-Tikhonenko, A. (2015). Convergence of acquired mutations and alternative splicing of *CD19* enables resistance to CART-19 immunotherapy. *Cancer Discovery*, 5(12), 1282–1295. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1020

Sparmann, A., & Bar-Sagi, D. (2004). Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell*, 6(5), 447-458. doi:10.1016/j.ccr.2004.09.028

Srinivasan, R., & Wolchok, J. D. (2004). Tumor antigens for cancer immunotherapy: therapeutic potential of xenogeneic DNA vaccines. *Journal of Translational Medicine*, 2(1), 1-12. doi:10.1186/1479-5876-2-12

Stevanović, S., Draper, L. M., Langan, M. M., Campbell, T. E., Kwong, M. L., Wunderlich, J. R., ... Hinrichs, C. S. (2015). Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells. *Journal of Clinical Oncology*, 33(14), 1543-1550. doi:10.1200/JCO.2014.58.9093

Straten, P. T., & Garrido, F. (2016). Targetless T cells in cancer immunotherapy. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 4(1), 1-5. doi:10.1186/s40425-016-0127-z

Takahashi, H., Ogata, H., Nishigaki, R., Broide, D. H., & Karin, M. (2010). Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKK $\beta$ -and JNK1-dependent inflammation. *Cancer Cell*, 17(1), 89-97. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.008

Tesniere, A., Schlemmer, F., Boige, V., Kepp, O., Martins, I., Ghiringhelli, F., ... Kroemer, G. (2009). Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene*, 29(4), 482-491. doi:10.1038/onc.2009.356

Torgovnick, A., & Schumacher, B. (2015). DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Frontiers in Genetics*, 6, 157. doi:10.3389/fgene.2015.00157

Tsai, A. K., & Davila, E. (2016). Producer T cells: using genetically engineered T cells as vehicles to generate and deliver therapeutics to tumors. *Oncoimmunology*, 5(5), 1-9. doi:10.1080/2162402X.2015.1122158

Vadali, S. (2016) Personalized immunotherapy in cancer treatment: a mini review. *MOJ Immunology*, 3(1), 00070. doi:10.15406/ moji.2016.03.00070

Vakkila, J., & Lotze, M. T. (2004). Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nature Reviews Immunology*, 4(8), 641-648. doi:10.1038/nri1415

Vétizou, M., Pitt, J. M., Daillère, R., Lepage, P., Waldschmitt, N., Flament, C., ... Zitvogel, L. (2015). Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science*, 350(6264), 1079–1084. doi:10.1126/science.aad1329

Vigneron, N. (2015). Human tumor antigens and cancer immunotherapy. *BioMed Research International*, 2015, 1-17. doi:10.1155/2015/948501

Visser, K. E., Eichten, A., & Coussens, L. M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 6(1), 24-37. doi:10.1038/nrc1782

Vyas, D., Laput, G., & Vyas, A. K. (2014). Chemotherapy-enhanced inflammation may lead to the failure of therapy and metastasis. *OncoTargets and Therapy*, 7, 1015–1023. doi:10.2147/OTT.S60114

Waldner, M. J., & Neurath, M. F. (2009). Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development. *Seminars in Immunopathology*, 31(2), 249-256. doi:10.1007/s00281-009-0161-8

Wang, M., Yin, B., Wang, H. Y., & Wang, R.-F. (2014). Current advances in T-cell-based cancer immunotherapy. *Immunotherapy*, *6*(12), 1265–1278. doi:10.2217/imt.14.86

World Health Organization. (2015). World Health Statistics 2015. [Consultado a 26 de Março de 2016], Disponível em: [http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/2015/en/](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2015/en/)

Wu, S., Rhee, K. J., Albesiano, E., Rabizadeh, S., Wu, X., Yen, H. R., ... Housseau, F. (2009). A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nature Medicine*, *15*(9), 1016-1022. doi:10.1038/nm.2015

Xu, L. W., Chow, K. K., Lim, M., & Li, G. (2014). Current vaccine trials in glioblastoma: a review. *Journal of Immunology research*, *2014*, 1-10. doi:10.1155/2014/796856

Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental Cell*, *14*(6), 818-829. doi:10.1016/j.devcel.2008.05.009

Zijl, F., Krupitza, G., & Mikulits, W. (2011). Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *728*(1), 23-34. doi:10.1016/j.mrrev.2011.05.002

Zinkernagel, R. M. (2002). On cross-priming of MHC class I-specific CTL: rule or exception?. *European Journal of Immunology*, *32*(9), 2385-2392. doi:10.1002/1521-4141(200209)32:9<2385::AID-IMMU2385>3.0.CO;2-V

*Anexos*

**Tabela 1:** Indicações Terapêuticas do Ipilimumab, Nivolumab, Pembrolizumab e do Sipuleucel-T (RCM, 2011, 2013, 2015a, 2015b).

	DCI	Nome Comercial	Indicação Terapêutica
<b>Inibidores do Checkpoint</b>	Ipilimumab	Yervoy®	❖ Melanoma avançado (irressecável ou metastático) em adultos.
	Nivolumab	Opdivo®	❖ Melanoma avançado (irressecável ou metastático) em adultos, em monoterapia ou em associação com ipilimumab; ❖ CPCNP localmente avançado ou metastático, após quimioterapia prévia em adultos; ❖ Carcinoma de células renais (CCR) após terapêutica prévia em adultos.
	Pembrolizumab	Keytruda®	❖ Em monoterapia está indicado para o tratamento do melanoma avançado (irressecável ou metastático) em adultos; ❖ CPCNP localmente avançado ou metastático em adultos cujos tumores expressam PD-L1 e que receberam pelo menos um esquema de tratamento prévio com quimioterapia. Doentes com mutações tumorais positivas EGFR ou ALK, devem ter recebido a aprovação da terapêutica para essas mutações, antes do tratamento com este medicamento.
<b>Vacina</b>	Sipuleucel-T *	Provenge®	❖ Cancro da próstata metastizado resistente à castração, assintomático ou minimamente sintomático (não visceral), em doentes adultos do sexo masculino para quem a quimioterapia ainda não está clinicamente indicada.

\*→ Atualmente Revogado.

**Tabela 2-** Efeitos adversos muito frequentes e frequentes do Ipilimumab, Nivolumab, Pembrolizumab e do Sipuleucel-T (RCM, 2011, 2013, 2015a, 2015b).

	<b>Neoplasias benignas, malignas e não especificadas (incluindo quistos e pólipos)</b>	<b>Doenças endócrinas</b>	<b>Doenças do metabolismo e da nutrição</b>	<b>Perturbações do foro psiquiátrico</b>	<b>Doenças do sistema nervoso</b>	<b>Afeções oculares</b>
<b><i>Ipilimumab</i></b>	-Dor tumoral (F)	-Hipofunção hipofisária (incluindo hipofisite), hipotiroidismo (F)	-Apetite diminuído (MF) -Desidratação, hipocaliemia (F)	-Estado confusional (F)	-Neuropatia sensorial periférica, tonturas, cefaleias, letargia (F)	-Visão turva, dor ocular (F)
<b><i>Nivolumab em Monoterapia</i></b>		-Hipotiroidismo, hipertiroidismo, hiperglicemia <sup>A</sup> (F)	Diminuição do apetite (MF)		-Neuropatia periférica, cefaleia, tonturas (F)	-Visão turva, olhos secos (F)
<b><i>Nivolumab em associação com Ipilimumab</i></b>		-Hipotiroidismo (MF) -Insuficiência suprarrenal, hipopituitarismo, hipofisite, hipertiroidismo, tiroidite, hiperglicemia <sup>A</sup> (F)	-Diminuição de apetite (MF) -Desidratação (F)		-Cefaleia (MF) -Neuropatia periférica, tonturas (F)	-Uveíte visão turva (F)
<b><i>Pembrolizumab</i></b>		- Hipertiroidismo, hipotiroidismo <sup>B</sup> (F)	-Apetite diminuído (F)		- Cefaleia, tonturas, disgeusia (F)	-Olho seco (F)
<b><i>sipuleucel-T *</i></b>					-Tonturas, parestesia <sup>C</sup> , parestesia oral <sup>C</sup> , cefaleias (MF) -Acidente cerebrovascular, acidente isquêmico transitório, tremor, hipoestesia, compressão da espinal medula, síncope (F)	

	<b>Vasculopatias</b>	<b>Doenças respiratórias, torácicas e do mediastino</b>	<b>Afeções Hepatobiliares</b>	<b>Afeções dos tecidos cutâneos e subcutâneos</b>	<b>Afeções músculo-esqueléticas e dos tecidos conjuntivos</b>
<b><i>Ipilimumab</i></b>	-Hipotensão, afrontamento, rubor quente (F)	-Dispneia, tosse (F)	-Função hepática anormal (F)	-Erupção cutânea, prurido (MF) -Dermatite, eritema, vitiligo, urticária, eczema, alopecia, suores noturnos, xerose cutânea (F)	-Artralgia, mialgia, dor músculo-esquelética, espasmos musculares (F)
<b><i>Nivolumab em Monoterapia</i></b>	-Hipertensão (F)	-Pneumonite <sup>D, A</sup> , dispneia, tosse (F)		-Erupção cutânea <sup>E</sup> , prurido (MF) -Vitiligo, xerose cutânea, alopecia (F)	-Dor musculoesquelética, artralgia (F)
<b><i>Nivolumab em associação com Ipilimumab</i></b>	-Hipertensão (F)	-Pneumonite <sup>D, A</sup> , embolismo pulmonar <sup>D</sup> , dispneia, tosse (F)	-Hepatite <sup>A</sup> (F)	-Erupção cutânea <sup>E</sup> , prurido (MF) -Vitiligo, xerose cutânea, eritema, alopecia, urticária (F)	-Artralgia (MF) -Dor musculoesquelética <sup>G</sup> (F)
<b><i>Pembrolizumab</i></b>		-Pneumonite <sup>H</sup> , dispneia, tosse (F)		- Erupção cutânea <sup>I</sup> , prurido <sup>J</sup> (MF) - Reações cutâneas graves <sup>L</sup> , vitiligo <sup>M</sup> , dermatite acneiforme, pele seca, eritema, eczema (F)	-Artralgia (MF) - Miosite <sup>N</sup> , dor musculoesquelética <sup>O</sup> , dor nas extremidades, artrite <sup>P</sup>
<b><i>Sipuleucel-T *</i></b>	-Hipertensão, hipotensão (F)	-Hipoxia, sibilos, dispneia (F)		-Erupção cutânea, hiperidrose, prurido, urticária (F)	-Artralgia, mialgia (MF) -Espasmos musculares <sup>C</sup> (F)

	<b>Perturbações gerais e alterações no local de administração</b>	<b>Infeções e infestações</b>	<b>Doenças do sistema imunitário</b>	<b>Cardiopatias</b>	<b>Complicações de intervenções relacionadas com lesões e intoxicações</b>
<b><i>Ipilimumab</i></b>	-Fadiga, reação no local da injeção, pirexia (MF) -Arrepios, astenia, edema, dor, estado gripal (F)				
<b><i>Nivolumab em Monoterapia</i></b>	-Fadiga (MF) -Pirexia, edema (incluindo edema periférico) (F)	-Infeção do trato respiratório superior (F)	-Reação relacionada com a perfusão <sup>A</sup> , hipersensibilidade (F)		
<b><i>Nivolumab em associação com Ipilimumab</i></b>	-Fadiga, pirexia (MF) -Edema (incluindo edema periférico), dor (F)	-Pneumonia <sup>D</sup> , infeção do trato respiratório superior (F)	-Reação relacionada com a perfusão <sup>A</sup> , hipersensibilidade (F)	-Taquicardia (F)	
<b><i>Pembrolizumab</i></b>	-Fadiga (MF) -Astenia, edema <sup>Q</sup> , pirexia, estado gripal, arrepios (F)		- Reação associada a perfusão intravenosa <sup>R</sup> (F)		
<b><i>Sipuleucel-T *</i></b>	-Arrepios, fadiga, pirexia, dor, astenia (MF) -Síndrome gripal, mal-estar torácico (F)	-Bacterémia (F)		-Fibrilhação auricular (F)	-Toxicidade de Citrato <sup>c</sup> (MF)

	<b>Doenças renais e urinárias</b>	<b>Exames complementares de diagnóstico</b>	<b>Doenças gastrointestinais</b>	<b>Doenças do sangue e sistema linfático</b>
<i><b>Ipilimumab</b></i>		-Alanina aminotransferase aumentada (ALT), aspartato aminotransferase aumentada (AST), fosfatase alcalina no sangue aumentada, bilirrubinemia aumentada, peso diminuído (F)	-Diarreia, vômitos, náuseas (MF) - Hemorragia gastrointestinal, colite <sup>S</sup> , obstipação, doença de refluxo gastroesofágico, dor abdominal, inflamação da mucosa (F)	-Anemia, linfopenia (F)
<i><b>Nivolumab em Monoterapia</b></i>		-AST aumentada, ALT aumentada, fosfatase alcalina aumentada, lipase aumentada, amilase aumentada, hipocalcemia, creatinina aumentada, linfopenia, leucopenia, trombocitopenia, anemia, hipercalcemia, hipercaliemia, hipocaliemia, hipomagnesemia, hiponatremia (MF) -Bilirrubina total aumentada, neutropenia, hipermagnesemia, hipernatremia, descréscimo do peso (F)	-Diarreia, náuseas (MF) -Colite, estomatite, vômitos, dor abdominal, obstipação, boca seca (F)	
<i><b>Nivolumab em associação com Ipilimumab</b></i>	-Insuficiência renal <sup>C,A</sup> (F)	-AST aumentada, ALT aumentada, bilirrubina total aumentada, fosfatase alcalina aumentada, lipase aumentada, amilase aumentada, creatinina aumentada, linfopenia, leucopenia, neutropenia, trombocitopenia, anemia, hipocalcemia, hipercaliemia, hipocaliemia, hipomagnesemia, hiponatremia (MF) -Hipercalcemia, hipermagnesemia, hipernatremia, descréscimo do peso (F)	-Colite, diarreia, vômitos, náuseas, dor abdominal (MF) -Estomatite, gastrite, obstipação, boca seca (F)	-Eosinofilia (F)
<i><b>Pembrolizumab</b></i>		- ALT aumentada, AST aumentada, fosfatase alcalina no sangue aumentada, creatininemia aumentada (F)	-Diarreia, náuseas (MF) -Colite <sup>T</sup> , vômito, dor abdominal <sup>U</sup> , obstipação, boca seca (F)	-Anemia (F)
<i><b>Sipuleucel-T *</b></i>	-Hematúria (F)		-Vômitos, náuseas (MF) -Dor abdominal (F)	-Anemia <sup>C</sup> (MF) -Trombocitopenia <sup>C</sup> (F)

**Legenda:**

A → Foram notificados casos potencialmente fatais em estudos clínicos já completos ou ainda a decorrer;

B → Hipotireoidismo que pode originar mixedema;

C → Associado essencialmente ao procedimento de leucaferese;

D → Foram notificados desfechos fatais em estudos clínicos já completos ou ainda a decorrer;

E → O termo erupção cutânea engloba a erupção maculopapular, erupção eritematosa, erupção pruriginosa, erupção folicular, erupção macular, erupção morbiliforme, erupção papular, erupção pustular, erupção escamosa papular, erupção vesicular, erupção generalizada, dermatite, dermatite acneiforme, dermatite alérgica, dermatite atópica, dermatite bolhosa, dermatite esfoliativa, dermatite psoriasiforme, e erupção cutânea medicamentosa;

G → O termo dor musculoesquelética engloba dor nas costas, dor óssea, dor musculoesquelética torácica, desconforto musculoesquelético, mialgia, dor no pescoço, dor nas extremidades e dor espinal;

H → Pneumonite, com desenvolvimento de uma doença pulmonar intersticial;

I → O termo Erupção cutânea engloba erupção eritematosa, erupção folicular, erupção generalizadas, erupção macular, erupção máculopapulosa, erupção papulosa, erupção pruriginosa, erupção vesiculosa e erupção cutânea genital;

J → O termo Prurido engloba urticária, urticária papular, prurido generalizado e prurido genital;

L → O termo reações cutâneas graves engloba dermatite exfoliativa, eritema multiforme, rash cutânea exfoliativa, pênfigo, síndrome de Stevens-Johnson e os seguintes com grau > 3: prurido, erupção cutânea, erupção cutânea generalizada e erupção cutânea maculo-papular;

M → O termo vitiligo engloba despigmentação da pele, hipopigmentação da pele e hipopigmentação da pálpebra;

N → O termo miosite engloba mialgia, miopatia, polimialgia reumática e rabdomiólise;

O → O termo dor musculoesquelética engloba desconforto musculoesquelético, dor dorsal, rigidez musculoesquelética, dor no peito musculoesquelética e torcicolo;

P → O termo artrite engloba inchaço das articulações, poliartrite e efusão das articulações;

Q → O termo edema engloba edema periférico, edema generalizado, sobrecarga de líquidos, retenção de líquidos, edema da pálpebra e edema do lábio, edema da face, edema localizado e edema periorbital;

R → O termo reações relacionadas com a perfusão engloba hipersensibilidade ao fármaco, reação anafilática, hipersensibilidade e síndrome de libertação de citocinas;

S → Abrangendo desfecho fatal;

T → O termo colite engloba colite microscópica e enterocolite;

U → O termo dor abdominal engloba desconforto abdominal, dor abdominal superior e dor abdominal inferior;

\*→ Atualmente Revogado;

F→ Frequente;

MF→Muito Frequente.