



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Tiago André Silva Fidalgo

Relatórios de Estágio e Monografia Intitulada “Imunoterapia Ativa com Vacinas de mRNA para Tumores Sólidos: Abordagem de Neoantigénios” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Doutora Isabel Folhas, da Doutora Marta Simões e do Professor Doutor João Nuno Sereno de Almeida Moreira e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Tiago André Silva Fidalgo

Relatórios de Estágio e Monografia Intitulada “Imunoterapia Ativa com Vacinas de mRNA para Tumores Sólidos: Abordagem de Neoantígenios” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Isabel Folhas, da Dra. Marta Simões e do Professor Doutor João Nuno Sereno de Almeida Moreira e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

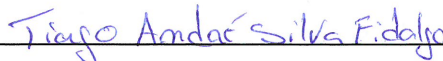
Setembro de 2022

Declaração de Responsabilidade

Eu, **Tiago André Silva Fidalgo**, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º **2017251288**, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “**Imunoterapia Ativa com Vacinas de mRNA para Tumores Sólidos: Abordagem de Neoantigénios**” apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 05 de setembro de 2022.



(Tiago André Silva Fidalgo)

Agradecimentos

À minha família, por tornarem possível esta jornada.

Aos meus pais, Marco e Fátima e à minha irmã Rute pelo apoio incondicional, por todo o afeto, por me terem ajudado a ultrapassar todos os obstáculos durante estes 5 anos, mas principalmente pela forma como me educaram, pelos valores que me inculcaram, por toda a força que me transmitiram e por me terem tornado a pessoa que sou hoje. A vós, a minha eterna gratidão.

Ao meu avô José e à minha avó Aurora, por sempre terem cuidado de mim como seu filho, pelas suas histórias e pelo seu amor.

À Eliana e à Ivanna, pelas horas a fio em “reunião”, por todas as saídas à última da hora, pelo ombro amigo, por todos os desabafos e por me terem proporcionado nestes 5 anos, momentos inesquecíveis que irei levar comigo para a vida.

Às minhas amigas Francisca, Diana e Garcia, por serem a minha segunda família, pela companhia, pelo convívio e pelos inúmeros conselhos.

À Margarida e à Sofia, pela amizade, por todas as chamadas e por todas as conversas das quais guardo muita saudade.

À Família Pinheiro, por me terem acolhido, pelo companheirismo, pelos jantares, por todos os passeios e pelas incontáveis sessões de cinema noturnas.

A toda a minha família de praxe, Helena, Bá, Mariano, Fábio e Hidro, por toda a dedicação e por me terem guiado durante o meu percurso.

Ao Professor Doutor João Nuno Moreira, por todos os conhecimentos que me transmitiu durante as suas aulas, por ser um dos ídolos do meu trajeto académico, pelo tempo que me dedicou enquanto orientador da minha monografia e por todo o auxílio para a sua concretização.

A todo a equipa do departamento de formulação da Bluepharma, Marta, Feteira, Cidália, Sara, Gustavo, José, Patrícia, Ana Luísa, Rita, Ana Rita e João, pela forma como me receberam durante o meu estágio, por todo o carinho que comigo tiveram e pelo conhecimento que me passaram.

À Dra. Isabel Folhas e ao Dr. António, por me terem permitido realizar o meu estágio na sua farmácia e por toda a confiança em mim depositada, durante este percurso. A todos os elementos da Farmácia Isabel Folhas, Nélia, Susana, Zaida, Hugo e António, por todo o cuidado e atenção que comigo tiveram, por terem tornado o meu estágio um verdadeiro momento de aprendizagem, pelo seu auxílio e pelos valores humanos que me transmitiram, são uma verdadeira referência de profissionais de saúde.

Ao corpo docente e a todo o pessoal não docente da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

A Coimbra e a todos vós, o meu mais sincero,

Obrigado!

*“The only place success comes before
work is in the dictionary.”*

Vince Lombardi

Índice

PARTE I

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA FARMÁCIA ISABEL FOLHAS

Abreviaturas.....	10
1. Introdução.....	11
1.1. Farmácia Isabel Folhas	12
2. Análise SWOT	13
2.1. Forças.....	13
2.1.1. Plano de Estágio.....	13
2.1.2. Equipa e Ambiente de Trabalho	14
2.1.3. Tecnologia	14
2.1.4. Formações	14
2.2. Fraquezas.....	15
2.2.1. Serviços Encerrados	15
2.2.2. Receitas Manuais	15
2.2.3. Medicamentos Veterinários e Dispositivos Médicos	15
2.3. Oportunidades	16
2.3.1. Preparação de Medicamentos Manipulados	16
2.3.2. Formações	16
2.3.3. Participação na Gestão de Topo	16
2.4. Ameaças.....	17
2.4.1. Atendimento Diferencial	17
2.4.2. COVID-19	17
3. Considerações Finais	17
4. Bibliografia	19
5. Anexos	22
5.1. Anexo 1: Casos Clínicos.....	22
5.1.1. Caso 1 – Contraceção de Emergência.....	22
5.1.2. Caso 2 – Eritema/Dermatite da Fralda	22
5.1.3. Caso 3 – Cessação Tabágica	23
5.1.4. Caso 4 – Distúrbios do Sono e Alterações de Humor	24
5.1.5. Caso 5 – Preparação para Colonoscopia	25
6. Anexo 2: Pharmashop	27

PARTE II

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA BLUEPHARMA

Abreviaturas.....	29
1. Introdução.....	30
1.1. Bluepharma	31
2. Análise SWOT	31
2.1. Forças.....	32
2.1.1. Plano de Estágio.....	32
2.1.2. Equipa e Ambiente de Trabalho	32
2.1.3. Dimensão das Instalações	33

2.1.4. Formações Internas e Apresentações.....	33
2.1.5. Acompanhamento de Diferentes Projetos e Formuladores.....	34
2.1.6. Trabalho Laboratorial.....	34
2.2. Fraquezas.....	35
2.2.1. Limitação Temporal.....	35
2.2.2. Controlo Documental.....	35
2.3. Oportunidades.....	36
2.3.1. Inclusão nas Reuniões de Projetos.....	36
2.3.2. Contacto com Outros Departamentos.....	36
2.4. Ameaças.....	36
2.4.1. Auditorias.....	36
2.4.2. Disponibilidade de Salas e Equipamentos.....	37
3. Considerações Finais.....	37
4. Bibliografia.....	39
5. Anexo.....	40
5.1. Anexo I.....	40

PARTE III

“IMUNOTERAPIA ATIVA COM VACINAS DE MRNA PARA TUMORES SÓLIDOS: ABORDAGEM DE NEOANTIGÉNIOS”

Abreviaturas.....	42
Resumo.....	44
Abstract.....	45
1. Introdução.....	46
2. Mutações Tumoriais.....	46
3. Tipos de Antígenos Tumoriais.....	47
4. Neoantígenos.....	48
4.1. Classe de Neoantígenos.....	49
4.1.1. Tipo de Mutação.....	49
4.1.2. Relevância Clínica.....	50
4.1.3. Heterogeneidade.....	51
4.2. Papel dos Neoantígenos na Resposta Imunitária.....	51
5. Imunoterapia: Desafios em Tumores Sólidos.....	51
5.1. Imunomodulação/Imunoedição.....	52
5.2. Estratégias de Evasão Tumoral.....	53
5.3. Imunossupressão Tumoral.....	53
5.3.1. Sobreexpressão de Immune Checkpoints.....	53
5.3.2. Células Imunossupressoras.....	54
6. Imunidade Ativa e Imunidade Passiva.....	58
6.1. Imunidade Passiva.....	59
6.2. Imunidade Ativa.....	59
7. Vacinas Antitumorais.....	59
7.1. Alvos Moleculares.....	60
7.2. Vacinas de Células Tumoriais.....	61
7.3. Vacinas de Células Dendríticas.....	61

7.4.	Vacinas Peptídicas.....	62
7.5.	Vacinas de DNA	63
7.6.	Vacinas de mRNA.....	63
7.6.1.	Nanopartículas.....	66
7.6.2.	Transporte, Expressão e Apresentação de mRNA in vivo	66
7.6.3.	Nanopartículas Lipídicas	67
7.6.4.	Ensaio Clínico.....	70
8.	Limitações e Desafios Futuros.....	75
9.	Conclusão.....	76
10.	Referências Bibliográficas.....	77



**FARMÁCIA
ISABEL FOLHAS**

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária Farmácia Isabel Folhas

Estágio sob a orientação da Dra. Isabel Maria Fresco Costa Folhas

Janeiro de 2022 – abril de 2022

Abreviaturas

CEM – Contraceção de Emergência

COVID-19 – Doença do Coronavírus

MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

MSRM – Medicamento Sujeito a Receita Médica

SWOT – Forças, Fraquezas, Oportunidades e Ameaças

I. Introdução

O farmacêutico comunitário, como interveniente na preparação de medicamentos, data do fim da Idade Média, onde era conhecido como boticário.¹ Desde essa era, várias foram as alterações que se fizeram sentir, tanto ao nível dos cuidados de saúde, como no contributo dos farmacêuticos para estes cuidados. Embora não esteja descrito, o papel dos farmacêuticos nos cuidados primários de saúde, tem vindo a ser considerado um elemento-chave para alcançar uma saúde universal.²

Com a descentralização da profissão na doença, o trabalho prestado pelos farmacêuticos comunitários passa a ser focado no doente.^{1,2} Tais alterações contribuíram também para a mudança das suas responsabilidades, tornando a identificação, resolução e prevenção de problemas derivados do medicamento, a sua principal função.³

Dada a ampla distribuição nacional e a constituírem muitas vezes, as únicas instalações de saúde disponíveis à população, as farmácias comunitárias adquirem uma perspetiva de pontos estratégicos, para assegurar a saúde e o bem-estar dos cidadãos.^{1,4} De modo a acompanharem o envelhecimento da população e o conseqüente aumento das suas necessidades em saúde, estes estabelecimentos suportam-se essencialmente na formação e qualificação dos seus profissionais, para a prestação de serviços.²

Portugal é reconhecido, como um dos membros da União Europeia que mais serviços farmacêuticos disponibiliza à sua população, porém grandes reformas têm ocorrido neste campo, dando origem ao conceito de cuidados farmacêuticos.^{1,3} Estes cuidados, além de incluírem a atividade dos farmacêuticos como parte integrante de cuidados primários de saúde, englobam igualmente um ponto de vista ambiental das suas funções, bem como a atuação na sua área de conhecimento, o medicamento. Desta forma, os farmacêuticos são responsáveis por temas diversos, como a literacia em saúde e a promoção de estilos de vida saudáveis, a administração de medicamentos e a imunização da população, a análise de parâmetros bioquímicos e ainda a deteção e prevenção precoce de doenças. Ao nível do medicamento, propriamente dito, podem auxiliar os seus utentes recorrendo a serviços de farmacoterapia, aconselhamento, dispensa, revisão, reconciliação, otimização e por fim, gestão da medicação. A atividade do farmacêutico é extensa, alargando-se igualmente até à saúde ambiental, de forma direta, através da gestão de resíduos e cooperação com os programas de reciclagem e de forma indireta, pela promoção de uma atitude sustentável nos seus utentes, visando assegurar o uso racional dos medicamentos e dos recursos de saúde disponíveis.^{1,3,4,5}

Tendo o objetivo de providenciar aos seus estudantes, as ferramentas e conhecimentos necessários à execução exemplar das suas funções futuras, o plano curricular do Mestrado

Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Coimbra é multivalente. Durante os 10 semestres deste curso, a Faculdade de Farmácia proporciona aos seus estudantes aulas, onde estes podem adquirir os conceitos básicos das diferentes fases e áreas do medicamento, com particular destaque às Unidades Curriculares de Farmacologia, Farmacoterapia, Farmacovigilância, Farmacologia Clínica e Indicação Farmacêutica pela sua importância direta, no dia-a-dia dos farmacêuticos comunitários. No seu último semestre, este mestrado conta com uma componente prática de estágio, onde os alunos são colocados em farmácias comunitárias, de modo a possibilitar o contacto com as funções diárias desempenhadas por farmacêuticos, além de permitir que aprofundem e coloquem em prática os conhecimentos, obtidos ao longo dos 5 anos de curso.

Deste modo, este relatório surge no âmbito da Unidade Curricular “Estágio”, com o objetivo de descrever o meu estágio na Farmácia Isabel Folhas, sob orientação da Dra. Isabel Maria Fresco Costa Folhas e que decorreu de 10 de janeiro a 20 de abril. Ao longo deste documento, será feita a apresentação inicial da farmácia, seguindo-se a análise SWOT do estágio, breves considerações finais e por fim, serão disponibilizados, em anexo, 5 casos clínicos (**Anexo I**).

1.1. Farmácia Isabel Folhas

A Farmácia Isabel Folhas está localizada na rua Carolina Michaelis n.º20, no bairro da Solum, em Coimbra, uma posição privilegiada no centro da cidade, onde se encontra acompanhada por vários negócios e estruturas de ensino locais. Esta farmácia encontra-se em horário laboral de segunda a sexta-feira das 9h às 20h e ao sábado da parte da manhã das 9h às 13h, exceto dias de serviço permanente.

Nesta farmácia, a direção técnica está sob a responsabilidade da Dra. Isabel Folhas, a qual lidera em conjunto com o Dr. António Pereira, uma equipa constituída por 4 farmacêuticos, 1 técnica auxiliar de farmácia, 1 trabalhador indiferenciado, 1 estagiário e 1 elemento de manutenção e limpeza. No decorrer da atividade diária da Farmácia Isabel Folhas, os seus membros tomam lugar em funções distintas nos diversos setores desta empresa. A gestão de topo formada pela Dra. Isabel Folhas e o Dr. António Pereira, diretor do departamento de qualidade e consultor da farmácia, assumem responsabilidades no posicionamento estratégico da farmácia, no aprovisionamento de medicamentos, na gestão de documentação e recursos humanos, na atribuição de funções e estão ainda encarregues da secção de compras e parcerias, auxiliando, sempre que requerido, os restantes elementos nas suas tarefas. Aos restantes integrantes da equipa compete o atendimento ao balcão, o aconselhamento e dispensa de medicamentos, a prestação dos serviços praticados pela

farmácia, o auxílio na gestão de inventário e prazos de validade, a criação e promoção de ações de *marketing*, o fecho de receituário e a receção, devolução e organização de encomendas.

Embora em diferentes funções, são inculcados princípios de excelência, profissionalismo, empenho e empatia a todos os elementos da equipa de forma a que, a Farmácia Isabel Folhas seja reconhecida como referência no aconselhamento e na prestação de serviços farmacêuticos.

2. Análise SWOT

A análise SWOT é uma ferramenta simples de uso comum, para o planeamento estratégico empresarial, porém tem sido adaptada como uma abordagem para avaliar estratégias de ensino.^{6,7} Tendo em conta a última premissa, a análise SWOT será utilizada neste relatório para explorar e descrever os fatores internos (Forças e Fraquezas) e externos (Oportunidades e Ameaças), identificados durante o estágio.

2.1. Forças

2.1.1. Plano de Estágio

O meu percurso na Farmácia Isabel Folhas, teve início a 10 de janeiro de 2022, dia em que fui apresentado à equipa e em que pude conhecer as suas instalações. Após este primeiro contacto e dado ser uma farmácia certificada foi-me facultado o “Manual de Estagiário”. A existência deste manual com um plano de estágio, previamente definido e adaptado aos meus conhecimentos, permitiu-me integrar, de forma gradual na atividade diária da farmácia, começando por tarefas mais rotineiras, como a gestão de inventário, a arrumação e a receção de encomendas.

Assim foi-me possível familiarizar tanto com o programa “Sifarma 2000®”, como com a designação comercial dos medicamentos e a sua disposição na farmácia. Ainda antes de passar à fase de atendimento ao público, tive a oportunidade de acompanhar os diferentes profissionais da farmácia no seu dia-a-dia, de modo a aprender como e o que aconselhar nas mais diversas situações. Já na fase final do meu estágio, esta estrutura de ensino contínuo verificou-se uma mais-valia, dado que os conhecimentos obtidos durante as fases anteriores, tanto ao nível do medicamento e do aconselhamento em saúde, como também em termos de *software* e organização espacial da farmácia, tornaram o meu atendimento mais fluído, ágil e completo.

2.1.2. Equipa e Ambiente de Trabalho

A relação interpessoal entre colaboradores de uma empresa, independentemente da sua dimensão, pode ser considerada um dos fatores mais importantes para a sua produtividade e sucesso.

Na Farmácia Isabel Folhas, desde o primeiro dia, fui recebido de braços abertos por uma equipa de profissionais exemplar, que proporcionou ao meu estágio uma dimensão humana, essencial às funções do farmacêutico comunitário. Ao longo de todo o meu estágio, estive inserido num ambiente altamente estimulante e dinâmico que me permitiu aprender de forma, mais rápida, uma vez que a equipa da Farmácia Isabel Folhas conseguiu despertar o meu gosto pela profissão. De facto, assistir de perto ao trabalho destes profissionais e à sua dedicação ao utente, enriqueceu o meu estágio, não só a nível profissional como pessoal.

2.1.3. Tecnologia

A Farmácia Isabel Folhas é um estabelecimento tecnológico, prendado com computadores modernos, uma montra digital, um “*Pharmashop*” (**Anexo 2**) e ainda um *robô* de última geração. Deste modo, os estagiários da Farmácia Isabel Folhas podem contactar de perto com as últimas inovações em farmácia, bem como beneficiar de uma formação empírica, sob o seu funcionamento e utilização.

A presença destes dispositivos durante o percurso nesta farmácia, possibilitou-me depreender como as novas tecnologias estão a ser adaptadas às farmácias comunitárias, bem como identificar o seu papel na atividade do farmacêutico. Estes novos equipamentos, com principal destaque ao *robô*, permitem reduzir o tempo gasto com tarefas rotineiras de logística, como a arrumação de medicamentos, o controlo de inventário e a gestão de validades, contribuindo para otimizar o tempo dos farmacêuticos e valorizar tanto o seu trabalho, como o seu conhecimento.

2.1.4. Formações

Considerando a constante evolução na área do medicamento e nos produtos de saúde e bem-estar, na Farmácia Isabel Folhas há uma aposta constante na formação, as quais são ministradas na sua maioria por delegados de informação médica, durante o horário laboral da farmácia.

Como membro estagiário desta equipa, tive a oportunidade de assistir a formações relativas a suplementos alimentares, medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) e cosméticos, que complementaram e alargaram os meus conhecimentos.

2.2. Fraquezas

2.2.1. Serviços Encerrados

Tendo em conta o aumento abrupto dos casos de COVID-19 no início do ano e considerando tanto as características, como as dimensões do gabinete onde seria realizada a maioria das determinações fisiológicas e bioquímicas, além dos testes audiológicos, a Farmácia Isabel Folhas sob voz da Dra. Isabel Folhas, optou por encerrar estes serviços, uma vez que não era possível salvaguardar a integridade da equipa.⁸

Apesar destes serviços terem sido abordados, de forma essencialmente teórica durante os 5 anos do mestrado, a componente empírica desenvolvida durante o estágio curricular é essencial à sua consolidação e aperfeiçoamento, além de possibilitar a familiarização e o ganho de agilidade com os equipamentos e procedimentos a utilizar.

Porém, o encerramento destes serviços na Farmácia Isabel Folhas, durante todo o meu período de estágio, impossibilitaram o ganho de experiência na execução destes serviços.

2.2.2. Receitas Manuais

Embora, nos dias que correm, as prescrições eletrónicas sejam de carácter obrigatório, alguns prescritores, quando devidamente identificados pelas suas ordens profissionais como – “inadaptados”, podem ainda utilizar receitas manuais.⁹

Estas receitas, em alguns locais já raras, dificultam muitas vezes o trabalho do farmacêutico comunitário, tal como me foi possível constatar e experienciar ao longo do estágio. A caligrafia, por vezes, ilegível ou de difícil compreensão, em conjunto com lapsos ou erros de preenchimento de alguns campos como a quantidade, a data, ou a assinatura, inviabilizam ou colocam em causa a qualidade do atendimento e aconselhamento farmacêuticos. Assim, durante o meu percurso na Farmácia Isabel Folhas, foi-me várias vezes necessário, pedir auxílio a colegas mais experientes e já habituados à caligrafia dos prescritores, de modo a não cometer nenhum lapso durante o meu atendimento, além de ter também contactado com diferentes médicos, de forma a minimizar o constrangimento para o utente, com estas situações.

2.2.3. Medicamentos Veterinários e Dispositivos Médicos

Considerando a sua localização citadina e os seus utentes, uma população maioritariamente envelhecida e com várias patologias crónicas, a Farmácia Isabel Folhas conta com um reduzido inventário de medicamentos veterinários, mas por outro lado, interage frequentemente com utentes que estão a iniciar ou utilizam dispositivos médicos.

Apesar de existirem 2 Unidades Curriculares no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, especialmente dedicadas a estes temas, considero que os conhecimentos aí adquiridos, são insuficientes para o dia-a-dia na farmácia. Além desta pequena limitação curricular, nenhuma das formações que tive oportunidade de frequentar, durante o estágio, incidiu sob medicamentos veterinários, ou sob a utilização e aconselhamento de dispositivos médicos, algo que acredito ter sido uma limitação. A ausência destes momentos auxiliares de aquisição de conhecimentos, levou a que me sentisse pouco à vontade, tanto em recomendar ou aconselhar medicamentos veterinários, como em educar os utentes na utilização dos dispositivos médicos.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Preparação de Medicamentos Manipulados

Um dos serviços desempenhado pelos farmacêuticos da Farmácia Isabel Folhas consiste na preparação e dispensa de medicamentos manipulados.

Apesar da sua disponibilidade, entre janeiro e abril de 2022, houve uma reduzida afluência a este serviço. Deste modo, penso que este, poderia ter sido um serviço mais bem explorado durante o meu estágio nesta farmácia.

2.3.2. Formações

Como já foi anteriormente referido, o meu estágio na Farmácia Isabel Folhas contemplou diversas formações em temas distintos, porém, existe ainda espaço para melhoria. Visto que, as áreas da higiene oral e dos cuidados nutricionais em crianças são, na minha opinião, temas pouco abordados na academia, a sua incorporação nas formações disponibilizadas aos estagiários, seria uma mais-valia. Com tais formações, os estudantes terminariam o estágio, com um maior leque de conhecimentos e mais aptos a desempenhar funções, sendo capazes de responder a questões simples, como “qual o leite mais adequado a uma criança”, tendo em conta a sua idade, peso, alergias alimentares, ou outras condições que possa ter a si associadas, além de sabermos quais os cuidados, conselhos ou produtos mais recomendados para os vários transtornos, intervenções e/ou condições na cavidade oral.

2.3.3. Participação na Gestão de Topo

Na Farmácia Isabel Folhas, as funções relacionadas com a gestão de topo são asseguradas tanto pela Dra. Isabel Folhas, como pelo Dr. António Pereira, ficando a restante equipa afastada destas tarefas. Embora este seja um tema sensível, dada a confidencialidade de

alguns documentos e informações, considero que deveria ser proporcionado um maior contacto dos estagiários com este ambiente, não só para melhor perceber as exigências de uma farmácia comunitária, mas também para compreender toda a logística necessária ao funcionamento da farmácia, além de aprender a desempenhar estas funções, que mais tarde nos podem ser exigidas.

Posto isto, considero que esta foi uma área que podia ter sido mais explorada durante o meu percurso na Farmácia Isabel Folhas dotando-me do conhecimento necessário para melhor compreender a importância do trabalho “por detrás do balcão” e identificar e conhecer diferentes formas de executar como, a título de exemplo, como analisar o mercado e posicionar a farmácia, ou como fazer a gestão e comunicação das movimentações de psicotrópicos e estupefacientes às entidades competentes.

2.4. Ameaças

2.4.1. Atendimento Diferencial

Ao longo dos 4 meses de estágio e particularmente já na sua última fase, pude notar alguma reticência, por parte dos utentes a serem atendidos por mim, alguns por terem relações familiares e outros por já conhecerem e terem uma maior afinidade com elementos da equipa que trabalham à mais tempo na Farmácia Isabel Folhas.

Este comportamento, se por um lado me permitiu perceber o grau de confiança que os utentes depositam no seu farmacêutico, destacando o seu relevo como profissional de saúde, por outro, impossibilitou-me, por vezes, a realizar atendimentos e a ganhar experiência profissional.

2.4.2. COVID-19

Ainda no decorrer do meu estágio curricular nesta farmácia, fui alvo da pandemia de COVID-19, tendo ficado em isolamento profilático de 6 a 13 de fevereiro de 2022. Apesar de não ter provocado sequelas, esta doença deixou-se afastado da Farmácia Isabel Folhas durante 1 semana, período no qual, não pude desempenhar funções, ganhar competências ou crescer profissionalmente com o estágio.

3. Considerações Finais

Ao longo destes 4 meses na Farmácia Isabel Folhas, tive o privilégio de estagiar com uma equipa de profissionais exímios na sua atividade e que prezam verdadeiramente pela saúde e bem-estar dos seus utentes. Durante este meu percurso, tive a oportunidade de aperfeiçoar

e alargar os meus conhecimentos na área do medicamento, bem como dar os primeiros passos na vertente comunitária da profissão. Foi-me ainda possível, aprender os pilares do farmacêutico comunitário, enquanto profissional de saúde que trabalha para o utente e em prole do utente, visando uma saúde universal. Acredito que esta “escola”, me enriqueceu enquanto profissional, tanto pelo desenvolvimento de capacidades, como pela perspetiva humana que me proporcionou e que é tão essencial no dia-a-dia do farmacêutico comunitário.

4. Bibliografia

1. Ordem Dos Farmacêuticos - **Áreas Profissionais: A Farmácia Comunitária**. [Acedido a 23 agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>
2. RIBEIRO, Nadine *et al.* - **Primary health care policy and vision for community pharmacy and pharmacists in Portugal**. *Pharmacy Practice*. 18:3 (2020), 2043. doi: 10.18549/PharmPract.2020.3.2043.
3. KOKANE, Jaiprakash V.; AVHAD, Pawan S. - **Role of Pharmacist in Health Care System**. *Journal of Community Health Management*. 3:1 (2016), 37–40. doi: 10.5958/2394-2770.2016.00013.2.
4. SANTOS, Henrique *et al.* - **OF.C-Noo2-00: Boas práticas de farmácia comunitária - Norma geral sobre o farmacêutico e pessoal de apoio**. Disponível na Internet em: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/qualidade/norma_geral_sobre_o_farmaceutico_e_o_pessoal_de_apoio_5695580485ab147f4836e5.pdf
5. GREGÓRIO, João; CAVACO, Afonso - **The pharmacist's guide to the future: Are we there yet?**. *Research in Social and Administrative Pharmacy*. 17:4 (2021), 795–798. doi: 10.1016/j.sapharm.2020.05.029.
6. PHADERMROD, Boonyarat *et al.* - **Importance-Performance Analysis based SWOT analysis**. *International Journal of Information Management*. 44 (2019), 194–203. doi: 10.1016/j.ijinfomgt.2016.03.009.
7. LONGHURST, Georga J. *et al.* - **Strength, Weakness, Opportunity, Threat (SWOT) Analysis of the Adaptations to Anatomical Education in the United Kingdom and Republic of Ireland in Response to the Covid-19 Pandemic**. *Anatomical Sciences Education*. 13:3 (2020), 301–311. doi: 10.1002/ase.1967.
8. LEITE, Pedro Pinto *et al.* - **Relatório de Monitorização da Situação Epidemiológica da COVID-19: Monitoring of COVID-19**. Disponível na Internet em: https://covid19.min-saude.pt/wp-content/uploads/2022/03/20220318_Monitorizacao_COVID-19_pdf-2396kb.pdf
9. Diário Da República Eletrónico - **DRE: Portaria n.º 161/2021, de 26 de julho**. [Acedido a 23 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://dre.pt/dre/detalhe/portaria/161-2021-168296689>
10. PAULINO, Ema *et al.* - **OF.C-N014-00: Norma específica sobre a intervenção farmacêutica na Contraceção de Emergência**. Ordem dos Farmacêuticos: Boas Práticas

de Farmácia Comunitária. (2015) 1–12. Disponível na Internet em: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/qualidade/norma_especifica_sobre_a_intervencao_farmaceutica_na_contracecao_de_emergencia_7929677925ab147ce85c39.pdf

11. INFARMED I.P. - **RCM: Postinor**. [Acedido a 17 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/>

12. CONCANNON, Patrick *et al.* - **Diaper dermatitis: A therapeutic dilemma. Results of a double-blind placebo controlled trial of miconazole nitrate 0.25%**. *Pediatric Dermatology*. 18:2 (2001), 149–155. doi: 10.1046/j.1525-1470.2001.018002149.x.

13. SCHEINFELD, Noah - **Diaper Dermatitis**. *American Journal of Clinical Dermatology*. 6:5 (2005), 273–281. doi: 10.2165/00128071-200506050-00001.

14. ISDIN - **ISDIN: Baby Naturals Pomada reparadora para a muda da fralda**. [Acedido a 17 agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://www.isdin.com/pt-PT/produto/baby-naturals-nutraisdin/AF-pomada-reparadora>

15. HEERES, Jan *et al.* - **Conazoles**. *Molecules*. 15:6 (2010), 4129–4188. doi: 10.3390/molecules15064129.

16. AFLOFARM - **Dextazin**. [Acedido a 17 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://www.dextazin.pt/>

17. LIMA, A. *et al.* - **O processo de cessação tabágica e o contributo do farmacêutico : impacto na saúde pública**. *Acta Farmacêutica Portuguesa*. 11:1 (2022) 43–68. Disponível na Internet em: <https://actafarmacêuticaportuguesa.com/index.php/afp/article/view/299/243>

18. INFARMED I.P. - **RCM: Dextazin**. [Acedido a 17 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/index.xhtml>

19. INFARMED, I. P. - **Protocolo Dispensa EF Citisiniclina 1,5mg Comprimidos**. [Acedido a 18 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/2106346/Protocolo+Dispensa+EF+Citisiniclina+1%2C5mg+Comprimidos/e1a6a521-c621-c53a-0e73-fa59b1715391>

20. OLIVEIRA, Gláucia Maria Moraes De *et al.* - **Recomendações de 2019 para a redução do consumo de tabaco nos países de língua portuguesa**. *Revista Portuguesa de Cardiologia*. 38:4 (2019), 233–244. doi: 10.1016/j.repc.2019.04.003.

21. POZA, J. J. *et al.* - **Melatonin in sleep disorders**. *Neurología*. 37:7 (2022), 575–585. doi: 10.1016/j.nrl.2018.08.002.

22. WILSON, Sue *et al.* - **British Association for Psychopharmacology consensus statement on evidence-based treatment of insomnia, parasomnias and circadian rhythm disorders: An update.** *Journal of Psychopharmacology*. 33:8 (2019), 923–947. doi: 10.1177/0269881119855343.
23. BULMAN, Amanda *et al.* - **Nutraceuticals as Potential Targets for the Development of a Functional Beverage for Improving Sleep Quality.** *Beverages*. 7:2 (2021), 33. doi: 10.3390/beverages7020033.
24. KOKTURK, Oguz; KANBAY, Asiye - **Tryptophan Metabolism and Sleep.** In Engin, Atila; Engin, Ayse Basak. *Tryptophan Metabolism: Implications for Biological Processes, Health and Disease.* New York: Humana Press, 2015. ISBN 9783319156309, p. 239–252.
25. BIAL - **Brainkin Noite & Dia®.** [Acedido a 18 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://www.bial.com/pt/produtos/brainkin-noite-dia/>
26. JENKINS, Trisha *et al.* - **Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis.** *Nutrients*. 8:1 (2016), 56. doi: 10.3390/nu8010056.
27. ATTARIAN, Hrayr - **Sleep Hygiene.** In ATTARIAN, HRAYR P.; SCHUMAN, CATHERINE. *Clinical Handbook of Insomnia.* Totowa, NJ : Humana Press, 2010. ISBN 978-1-60327-033-5, p. 183–191.
28. INFARMED, I. P. - **RCM: Plenvu.** [Acedido a 18 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/>
29. HASSAN, Cesare *et al.* - **Bowel preparation for colonoscopy: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline – Update 2019.** *Endoscopy*. 51:8 (2019), 775–794. doi: 10.1055/a-0959-0505.
30. COLCHER, Henry - **Bowel preparation before colonoscopy.** *Gastrointestinal Endoscopy*. 28:1 (1982), 39–40. doi: 10.1016/S0016-5107(82)72973-6.
31. CHUC; SNS; Ministério Da Saúde - **Preparação para colonoscopia - PLENVU®.** Disponível na Internet em: https://www.chuc.min-saude.pt/media/Gastreenterologia/2022/7_preparacao-para-colonosopia-plenvu.pdf
32. EXCLUSIVAS IGLESIAS - **Máquina vending - Ref: PharmaShop24.** [Acedido a 24 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://www.exclusivasiglesias.com/farmacia/pt/productos/maquina-vending-pharmashop24/>

5. Anexos

5.1. Anexo I: Casos Clínicos

5.1.1. Caso 1 – Contraceção de Emergência

Uma utente na casa dos 25 anos, dirigiu-se à farmácia para solicitar “a pílula do dia seguinte”.

Em conversa com a utente, consegui perceber que a contraceção de emergência (CEM) se destinava à própria e que esta, não tomava qualquer tipo de medicação. Após ter questionado, a utente indicou que em tempos já tinha tomado a “pílula”, mas que de momento não utilizava qualquer tipo de método contraceptivo e que a relação sexual tinha ocorrido à menos de 24 horas.

Tendo em conta estas informações, comecei por incentivar a utilização de métodos contraceptivos regulares, transmitindo a sua importância e eficácia. Aproveitei também para referir que, caso pretendesse reiniciar a toma da “pílula” diária, deveria em primeiro lugar consultar o seu médico, visto ser um medicamento sujeito a receita médica (MSRM) e de forma a garantir a sua adequabilidade.¹⁰

Posto isto e dado que a relação sexual tinha ocorrido à menos de 72 horas, aconselhei Postinor[®] numa toma única. O Postinor[®] é um medicamento não sujeito a receita médica (MNSRM), cujo princípio ativo são 1,5 mg de levonorgestrel, uma progesterona frequentemente utilizada na CEM e que impede, de forma transitória, a ovulação durante a fase folicular do ciclo menstrual.^{10,11} Ainda antes de ceder o medicamento, adverti a utente para potenciais efeitos secundários do levonorgestrel, sendo alguns destes: dores abdominais, cefaleias, tonturas e náuseas. Dei principal destaque aos vómitos como um possível efeito secundário e expliquei à utente que, no caso de vómitos ou diarreia nas 3 horas subsequentes à toma do Postinor[®], deveria repetir a toma do medicamento, para garantir a eficácia da CEM. Terminei o atendimento referindo que seria normal, sentir alterações no seu ciclo menstrual, mas que estas não seriam superiores a 3 dias, porém, se tal se verificasse deveria realizar um teste de gravidez ou entrar em contacto com um profissional de saúde.¹⁰

5.1.2. Caso 2 – Eritema/Dermatite da Fralda

Um pai na casa dos 30 anos deslocou-se à farmácia à procura de uma pomada para a “assadura da fralda”. O utente indicou-me que o filho de 4 meses estava com “rabinho assado” já há 2 dias e que queria algo eficaz, pois o bebé estava a piorar.

O eritema da fralda é uma condição dermatológica em forma de “w”, muito prevalente entre crianças. A sua aparição está em muito associada à retenção de fezes e urina pela fralda.

Tal retenção propicia a acumulação de humidade nesta zona, a qual aumenta a fricção entre a pele e a fralda, bem como a presença de enzimas e microrganismos que podem alterar a integridade da pele. A *Candida albicans* é um fungo muito prevalente na dermatite da fralda, sendo que a sua presença tem relação linear com o progresso da dermatite.^{12,13}

Neste contexto, aconselhei ao utente a aplicação de uma camada fina da pomada ISDIN babinaturals com miconazol, sob a pele limpa e seca, durante um período de 7 dias e a cada muda da fralda (conforme indicado pela marca).¹⁴ Expliquei ao utente que esta pomada, além de ajudar a reparar, contém miconazol, um antifúngico que previne o crescimento de microrganismos, nomeadamente a *Candida albicans*, constituindo assim uma boa opção para o estado atual do bebé.^{12,15} Contudo, ressaltei que se a condição não melhorasse nos dias seguintes, deveria consultar um profissional de saúde, de preferência com o filho, para que fosse possível fazer um exame visual e avaliar melhor o caso.

De forma complementar indiquei que, após a recuperação do menino, o utente deveria utilizar ou manter a utilização (caso já usasse) de um creme barreira, a cada muda da fralda, de forma a prevenir reincidências. Por fim aconselhei algumas medidas que, também iriam ajudar na recuperação e na prevenção da dermatite, como: aumentar a frequência da troca de fraldas; privilegiar fraldas descartáveis e com maior capacidade absorvente e substituir o gel de banho por um óleo de banho.¹³

5.1.3. Caso 3 – Cessação Tabágica

Dois utentes com idades entre os 40 e os 45 anos, marido e mulher, vêm à farmácia com intenção de deixar de fumar e pedem Dextazin[®]. O casal já se tinha deslocado à farmácia semanas antes, com o intuito de obterem informações relativamente a este medicamento que referiram ter sido aconselhado por um amigo. De forma complementar, disseram ainda que já tinham tentado deixar de fumar sem auxílio medicamentoso, mas que não tiveram sucesso.

O Dextazin[®] é um MNSRM de venda exclusiva em farmácia que contém 1,5 mg de citisiniclina, um ativo da família dos alcaloides, que apresenta uma afinidade de ligação aos recetores nicotínicos superior à nicotina, competindo com esta. Apesar da maior afinidade de ligação, este medicamento tem uma ação semelhante à nicotina, mas muito mais fraca.^{16,17,18}

O meu atendimento passou, em primeira instância, por perceber se os utentes tinham alguma patologia associada ou se tomavam algum medicamento, porém, percebi que eram perfeitamente saudáveis e não se encontravam medicados. Posto isto, comecei a avaliar o seu grau de motivação, de forma a depreender qual a sua vontade para parar de fumar. De seguida, realizei com os utentes um teste de Fagerström, para avaliar o grau de dependência. Com o

teste obtiveram a pontuação de 4/10. Durante todo o atendimento o casal demonstrou-se sempre cooperativo e interessado.¹⁹

Após realizar o teste e ter confirmado a motivação em largar este “vício”, expus alguns dos benefícios para a saúde da cessação tabágica como a diminuição do risco de patologias cardiovasculares, acidentes vasculares cerebrais, doenças pulmonares e mesmo neoplasias. Procurei também abordar a questão económica do tratamento, comparando o seu custo com o gasto mensal em tabaco e incentivei os utentes a escreverem uma lista de razões, pelas quais pretendiam deixar de fumar, para que mais tarde servisse como motivação e evitasse recaídas.^{19,20}

Antes de ceder o Dextazin[®], expliquei que seria muito importante escolher o dia de início do tratamento, privilegiando uma data em que estivessem mais cómodos e com uma maior disponibilidade temporal, de forma a cumprirem com a posologia e evitarem esquecimentos. Adicionalmente aconselhei-os a fazerem uma preparação nos dias que antecedem o regime terapêutico, procurando evitar ou diminuir a frequência dos hábitos impulsadores do ato de fumar, bem como optar por não fumar os cigarros até ao fim ou espaçarem a sua utilização ao longo do dia.

Posto isto, passei a explicar as 5 fases de tratamento do Dextazin[®], com auxílio visual do panfleto do medicamento, referindo que até ao 5º dia de tratamento deveriam abolir qualquer consumo de cigarros.^{16,19}

Por fim, mas não menos importante, alertei para os sintomas de abstinência que poderiam sentir (irritabilidade, dificuldade de concentração, insónia, aumento do apetite, sensação de tristeza e desejo de fumar), indicando que a prevalência e intensidade seria maior nos primeiros dias de tratamento, à exceção do desejo de fumar, o qual pode perdurar por mais tempo.^{18,19,20}

Algum tempo depois, o casal retornou à farmácia, satisfeitos com o tratamento.

5.1.4. Caso 4 – Distúrbios do Sono e Alterações de Humor

Uma utente desloca-se à farmácia e pede por algo que auxilie a sua mãe de 80 anos a dormir. Refere que esta não tem conseguido dormir muito bem e que demora muito a adormecer, indica que a situação já tinha ocorrido anteriormente, porém, tinha sido solucionada com um suplemento de melatonina, do qual não se recorda o nome. Ao dialogar com a utente, pude de igual forma perceber que a mãe era asmática e hipertensa, mas tinha ambas as patologias controladas. A utente revelou ainda que a senhora de 80 anos, ultimamente, andava mais “mal-humorada”, algo que não lhe era característico.

Perante o contexto descrito, expliquei à utente que com o avançar idade, os distúrbios do sono são mais frequentes, dada a menor produção de melatonina com o envelhecimento.^{21,22} De igual forma, transmiti a importância da melatonina como uma molécula fundamental para regular o nosso sono.^{21,23,24}

Deste modo e dado a mãe da utente ter mais de 55 anos, passei a aconselhar l comprimido de Brainkin® Noite e Dia 30 minutos antes de adormecer.^{22,25} Já com a ajuda visual do suplemento alimentar, indiquei que este seria uma boa opção, visto ter na sua composição não só melatonina, mas também triptofano, um aminoácido essencial que, além de contribuir para a regulação do sono, iria auxiliar no humor e bem-estar ao longo do dia.^{23,24,26}

Apesar da ajuda do suplemento alimentar, informei a utente que a prática de uma boa higiene do sono, seria sempre essencial, procurando cumprir com os horários de descanso, evitar o consumo de café durante a tarde, não realizar sestas e escolher um local de descanso cómodo e tranquilo.²⁷ Na eventualidade de não obter melhoras, aconselhei a utente a consultar com a mãe o seu médico de família.

5.1.5. Caso 5 – Preparação para Colonoscopia

Um homem de 46 anos dirige-se à farmácia para adquirir Plenvu®, faz-se acompanhar pelo guia de preparação para colonoscopia, o qual indica que o referido exame será realizado na semana seguinte, pelas 15 horas. Após ser questionado, revela saber que tem de ter cuidados com a alimentação, antes do exame, mas não sabe muito bem quais, referindo que na clínica onde irá fazer o exame só lhe deram o guia de preparação.

O Plenvu® é frequentemente dispensado em farmácias, mediante a apresentação do protocolo de preparação. Na sua composição este medicamento contém 3 saquetas (saqueta I, saqueta A e saqueta B) divididas por duas doses. O agente ativo nesta formulação é o macrogol, um laxante osmótico que aumenta tanto o volume, como a fluidez das fezes.²⁸

No contexto descrito, comecei por perceber se o utente era medicado com algum anticoagulante ou antiagregante e por outro lado, se tinha algum grau de disfunção renal, uma vez que estas situações carecem de especial atenção, no entanto pude constatar que não era o caso. Posto isto e com a devida calma, comecei por esclarecer algumas dúvidas do utente como “o que posso comer?”, “quando é que tenho de ingerir a preparação?” e “como é que preparo o medicamento?”. Assim, expliquei que, nos 3 dias anteriores ao exame, não deveria comer legumes, fruta, verduras, nem sementes. Como possíveis alimentos a consumir sugeri: carnes brancas, peixe, ovos, massa, batata, arroz e pão branco, porém, na refeição que antecederesse o início da preparação, indiquei que apenas poderia ingerir alimentos líquidos, ou

gelatina de cor clara, isto é, água, caldo de canja coado, chás de cores claras (exemplo: camomila), refrigerantes e sumos de fruta sem polpa.^{29,30,31}

Dado o exame estar agendado para a parte da tarde, pelas 15 horas, aconselhei-o a fazer a refeição líquida, ao jantar do dia anterior e a iniciar o medicamento, na manhã do dia do exame. Em seguida, informei-o que o medicamento era composto por 3 saquetas, uma referente à 1ª dose e as saquetas A e B, referentes à 2ª dose. Esclareci que cada uma das doses deveria ser dissolvida em 500 mL de água, sendo que o utente deveria ingerir cada uma das doses ao longo de 30 minutos e nos 30 minutos seguintes, beber mais 500 mL de água.³¹ Deste modo, passei a aconselhar a ingestão da primeira dose pelas 8 horas da manhã e da segunda às 11 horas, de forma a cumprir com um intervalo mínimo de 2 horas, entre doses.^{29,30} Ainda em conversa com o utente, revelei ser de extrema importância terminar a 2ª dose no máximo até às 12 horas e informei que, a partir deste momento, não deveria consumir qualquer tipo de líquidos até à colonoscopia, uma vez que iria ser anestesiado e nestes casos é necessário garantir uma margem de 2 a 3 horas antes do exame, sem ingestão de qualquer tipo de alimentos ou líquidos, sob risco de aspiração pulmonar.^{29,30,31}

Como informações finais, aconselhei o utente a colocar a preparação no frigorífico, de modo a mascarar o seu sabor salgado, bem como a ingerir a preparação com recurso a uma palhinha, com o intuito a não estimular o centro do vómito, o que poderia potenciar as náuseas e vómitos que são efeitos secundários comuns do Plenvu®.²⁸

Após todo o diálogo, disponibilizei detalhadamente e de forma escrita, as instruções e conselhos, para que fosse mais fácil ao utente, segui-las.^{29,30}

6. Anexo 2: Pharmashop



Figura I – Imagem exemplificativa do Pharmashop da farmácia.³²



Parte II

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica Bluepharma

Estágio sob a orientação da Dra. Marta Simões e supervisão do Dr. João Feteira

Maio de 2022 – julho de 2022

Abreviaturas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPF – Boas Práticas de Fabrico

COVID-19 – Doença do Coronavírus

FDA – “*Food and Drug Administration*”

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde

SWOT – Forças, Fraquezas, Oportunidades e Ameaças

I. Introdução

A indústria farmacêutica, um setor altamente competitivo onde o principal pilar é a inovação, tem encontrado um percurso tortuoso nos últimos anos. Apesar das suas elevadas receitas, as empresas farmacêuticas investem grande parte do seu lucro, na inovação e desenvolvimento, permitindo gerar novos medicamentos, responsáveis não só pela melhoria dos cuidados em saúde, como pelo aumento da qualidade e da esperança média de vida. Porém, as mudanças significativas dos últimos anos, sob fatores com influência direta no rácio risco-benefício do desenvolvimento de medicamentos originais, têm contribuído para uma indústria farmacêutica cada vez mais fragilizada, com um decrescente número de medicamentos aprovados. Assim, aos dias de hoje, assistimos à demanda de várias multinacionais farmacêuticas por alternativas atrativas e economicamente sustentáveis.¹

De forma idêntica, as empresas farmacêuticas de genéricos enfrentam também desafios. Os incentivos criados durante as últimas décadas, para a dispensa de medicamentos genéricos e a criação de vias abreviadas para a sua introdução no mercado, têm auxiliado a sua penetração nos mercados mundiais. No entanto, existe ainda muito a otimizar. No caso particular de Portugal, o mercado de genéricos representa um volume de 2460 milhões de euros, porém, e ao contrário do que ocorre nos Estados Unidos, demonstra uma baixa taxa de penetração, cerca de 48,4%, ficando também atrás de outros parceiros europeus.^{2,3}

Considerando a sua baixa cota de mercado, existem algumas estratégias políticas que podem ser aplicadas de modo a potenciar a penetração de genéricos, entre elas: a prescrição obrigatória pela denominação comum internacional, a regulação do preço de genérico para um mínimo correspondente a metade do medicamento original e a otimização do processo de substituição do medicamento original.^{2,3}

Tendo em conta o seu paradigma atual, a indústria farmacêutica é um setor extremamente cativante, mas muito competitivo e desafiante para os profissionais que trabalham ou venham a integrar esta área do medicamento.

Relativamente à capacidade deste setor industrial para captar novos talentos, segundo os dados disponibilizados pela “*American Association of Colleges of Pharmacy*”, existem cada vez mais alunos interessados em ingressar na indústria do medicamento, após a conclusão do seu ciclo de estudos.^{4,5}

Com o intuito de formar especialistas no medicamento, preparados para enfrentar e superar os desafios atuais da indústria farmacêutica, o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, lecionado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, proporciona aos seus estudantes noções teóricas e práticas, que lhes servirão de ferramentas para poderem

desempenhar as mais diversas funções, dentro da indústria do medicamento. É também com este âmbito que este mestrado proporciona aos seus estudantes a possibilidade de ingressarem numa experiência curricular em ambiente empresarial.

No decorrer deste relatório, será feita uma introdução sumária à Bluepharma, local que me acolheu durante o meu estágio curricular, seguindo-se uma análise SWOT do estágio e por fim algumas considerações finais.

1.1. Bluepharma

A Bluepharma é uma indústria farmacêutica de genéricos, com 21 anos de existência, sediada em São Martinho do Bispo, em Coimbra. Embora já muito premiada, esta empresa continua com uma forte aposta na criação de valor no setor do medicamento e na melhoria contínua dos seus serviços e produtos, aspirando a excelência na sua atividade.⁶

Desde 2001, ano em que a Bluepharma iniciou o seu percurso, várias são as conquistas que conseguiu alcançar, não só ao nível da sua qualidade, onde é certificada pelo INFARMED, FDA e ANVISA, mas também ao nível da sua dimensão, contando já com múltiplas instalações de investigação, produção e logística. Ao longo dos anos, tem também contribuído para a criação de emprego, constituindo aos dias de hoje, um grupo de mais de 20 empresas nacionais e internacionais.⁶

Em 2008, a Bluepharma lançou para o mercado o primeiro medicamento produzido nas suas instalações. A partir desta data tem investido cada vez mais no seu portfólio e na sua capacidade produtiva, albergando já várias tecnologias e possuindo uma capacidade produtiva de 3 bilhões de unidades de medicamentos sólidos orais, por ano. Atualmente, tem ao seu dispor um amplo conhecimento em fórmulas sólidas orais, medicamentos potentes, plataformas de administração na mucosa oral e injetáveis complexos, uma das suas mais recentes apostas.⁶

Apesar do seu crescimento exponencial nos últimos anos, a Bluepharma é uma empresa em constante inovação, com os olhos voltados para o futuro.

2. Análise SWOT

A análise SWOT é uma ferramenta simples de uso comum, para o planeamento estratégico empresarial, porém tem sido adaptada como uma abordagem para avaliar estratégias de ensino.^{7,8} Tendo em conta a última premissa, a análise SWOT será utilizada neste relatório para explorar e descrever os fatores internos (Forças e Fraquezas) e externos (Oportunidades e Ameaças), identificados durante o estágio.

2.1. Forças

2.1.1. Plano de Estágio

A minha integração na Bluepharma teve início no dia 2 de maio de 2022, onde pude conhecer alguma da sua história, bem como visitar as suas instalações e conhecer a equipa do Desenvolvimento de Formulação, onde fui colocado. Após esta apresentação inicial foi-me entregue o plano de estágio.

Cada um dos departamentos da Bluepharma conta com programa de estágio personalizado e inclusivo, que visa direcionar o estagiário num itinerário com um crescente grau de envolvimento e adaptado às funções do setor em que está inserido. Desta forma, pude contar com um plano de estágio inicialmente mais documental, com o intuito de me proporcionar conhecimentos básicos sob os protocolos a seguir, como agir em conformidade e quais as tecnologias que fazem parte do portefólio da empresa. Apesar desta parte documental inicial, rapidamente passei a acompanhar, no local, os diferentes projetos de medicamentos genéricos e processos, em desenvolvimento e em comercialização, respetivamente.

O planeamento antecipado da estrutura e das atividades dos seus estagiários consiste numa grande vantagem das experiências curriculares na Bluepharma, dado que os alunos dispõem de um “guião”, ajustado ao departamento em que se encontram alocados. O plano de estágio também descreve quais os momentos de aprendizagem essenciais, por onde o estudante deverá passar e contribui para um estágio mais organizado, coeso e coerente, com um progresso gradual de aprendizagem.

2.1.2. Equipa e Ambiente de Trabalho

No departamento de Desenvolvimento de Formulação e mais concretamente nas formas farmacêuticas sólidas orais, onde estive colocado durante os meus 3 meses de estágio, os planos de desenvolvimento de medicamentos genéricos, os quais eu designo neste documento por “projetos”, são atribuídos a 2 elementos, ficando um indicado como responsável principal e o segundo como seu substituto em caso de necessidade.

Para esta equipa, que representa um dos principais pilares da inovação desta empresa, a Bluepharma reuniu um grupo de profissionais de valências e percursos distintos, mas sempre focados num objetivo comum, o sucesso dos projetos. Neste departamento, o espírito de entreajuda, a boa disposição e a dedicação são elementos que fazem parte do seu dia-a-dia, o que o torna um dos departamentos mais unidos e um local onde se deseja trabalhar.

Ao longo do meu estágio, o ambiente deste grupo verificou-se muito enriquecedor, incentivando a produtividade e permitindo potenciar o processo de aquisição de novos conhecimentos, quer pela grande disponibilidade de toda a equipa para ensinar, quer pela proximidade que me foi possível criar com cada um dos elementos do departamento.

2.1.3. Dimensão das Instalações

Desde a sua constituição em 2001, a Bluepharma tem vindo a crescer cada vez mais a várias dimensões, uma das quais o tamanho das suas instalações e equipamentos.

Para um aluno do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, que nunca tenha estado numa indústria farmacêutica e que está maioritariamente familiarizado com instalações e equipamentos à escala laboratorial, contactar pela primeira vez com a dimensão industrial da Bluepharma é uma experiência muito estimulante. Assim, acredito que este contacto tenha sido crucial, não só para alargar os meus horizontes, como também para promover o meu desenvolvimento profissional, com a aquisição de competências relativas aos processos e aos medicamentos à dimensão industrial.

2.1.4. Formações Internas e Apresentações

Durante o meu percurso na Bluepharma e estando inserido numa equipa responsável pelo desenvolvimento de medicamentos genéricos, desde a sua formulação inicial, à sua produção numa escala pré-piloto ou, por vezes, numa escala industrial, o meu estágio foi repleto de momentos de formação práticos e teóricos que, de certo, enriqueceram os meus conhecimentos.

A Bluepharma disponibiliza aos seus estagiários, independentemente do seu departamento, uma formação inicial que ambiciona, não só introduzi-los à indústria farmacêutica, aos seus requisitos e funcionamento, mas também prepará-los para as funções que venham a desempenhar. Para lá destas formações iniciais, cada departamento conta com um conjunto de formações específicas, tendo em consideração os equipamentos que utilizam, o ambiente em que operam, as suas responsabilidades e também as tarefas que realizam. Com uma periodicidade semanal ou quinzenal, a Bluepharma faculta de igual forma aos seus funcionários, uma apresentação sob formato de entrevista, em horário laboral, onde são expostos temas científicos em investigação, além de tecnologias, metodologias ou programas em desenvolvimento ou em integração na empresa.

Dado o departamento em que me encontrava, disfrutei ainda de várias formações práticas, ministradas no local, incidindo tanto sob processos de obtenção de formas

farmacêuticas sólidas orais, como sob equipamentos utilizados e as variáveis de processo a controlar, o que contribuiu para expandir as minhas competências na área do medicamento.

2.1.5. Acompanhamento de Diferentes Projetos e Formuladores

Cada elemento do Desenvolvimento de Formulação tem pelo menos um ou dois projetos a seu cargo, tal possibilitou-me acompanhar várias e distintas fases do desenvolvimento de genéricos. Deste modo, ao longo do estágio pude perceber tanto o impacto de diferentes formulações para o mesmo processo, como o impacto do processo escolhido e das suas características, no desempenho final do produto.

Adicionalmente, acompanhar diferentes elementos da equipa, proporcionou-me várias perspetivas e métodos de trabalho, além de um maior conhecimento sobre as variáveis de formulação e processo e como as podemos controlar.

2.1.6. Trabalho Laboratorial

No decorrer dos 3 meses de estágio, foi-me proposto um desafio cujo tema compreendia a análise do impacto do grau e do fornecedor de diferentes desagregantes, na sua performance. Este desafio foi dividido em 2 etapas. Numa primeira fase, consultei a bibliografia disponível, de modo a identificar e selecionar possíveis testes a realizar em superdesagregantes, utilizados na Bluepharma, a fim de verificar as suas diferenças em termos de performance. Ainda nesta etapa inicial, preparei e apresentei um pequeno documento, com algumas propostas de testes a realizar, de entre os quais foram selecionados 3 para executar. A segunda fase deste desafio incluiu o planeamento de atividades, seleção dos excipientes a utilizar e execução dos testes. No fim, os dados foram compilados e expostos à equipa de Desenvolvimento de Formulação, sob o formato de uma apresentação (**Anexo I**), onde foram descritos os vários mecanismos de desagregação, identificados alguns dos fatores com maior impacto na performance dos desagregantes e selecionados os melhores fornecedores ou graus de cada desagregante, com base nos dados obtidos.

Com esta componente do estágio, pude desenvolver a minha capacidade de organização e de resolução de problemas, além de ter passado a conhecer melhor as várias etapas necessárias para a realização de testes e experiências, no contexto industrial.

2.2. Fraquezas

2.2.1. Limitação Temporal

Os estágios curriculares na Bluepharma, mais propriamente no Desenvolvimento de Formulação, possibilitam aos alunos colocados, a imersão num ambiente altamente estimulante, competitivo, exigente, com prazos apertados e onde a inovação está sempre presente, promovendo um grande desenvolvimento profissional, num período relativamente curto de tempo.

Porém, considerando o tipo de atividades deste setor, a duração do estágio pode ser um aspeto limitante. Dada a restrição temporal, durante o meu percurso na Bluepharma, não me foi possível acompanhar as diferentes fases de desenvolvimento de genéricos, em cada um dos projetos, do início ao fim, algo que condiciona o potencial do estágio neste departamento. De forma similar, a curta dimensão do estágio, impossibilitou que, no desafio que me foi colocado, pudesse testar um maior número de amostras ou executar testes com um maior grau de complexidade, os quais exigiam um maior aporte temporal.

2.2.2. Controlo Documental

As empresas farmacêuticas, pelo seu contributo direto na saúde da população, representam uma indústria altamente regulada, a fim de assegurar a eficácia, segurança e a qualidade dos medicamentos produzidos.

Tendo em conta esta exigência regulamentar, a indústria vê-se obrigada a trabalhar em conformidade com as Boas Práticas de Fabrico (BPF). De forma a assegurar este cumprimento, uniformemente pelas suas instalações, a Bluepharma implementou uma metodologia de trabalho segundo as BPF, em todas as suas atividades, o que contribui para uma maior exigência documental. Assim, todos processos do desenvolvimento ou produção de genéricos, têm de ser detalhadamente registados e arquivados, servindo de prova de conformidade com as BPF.

Apesar desta metodologia aumentar o rigor e ajudar a reduzir as falhas no ciclo do medicamento, traduz-se num maior dispêndio de tempo que acaba por abrandar a velocidade de produção ou desenvolvimento dos genéricos.

Deste modo, estas exigências documentais, condicionaram ainda que indiretamente, o número de processos e formulações a que pude assistir, além de terem sido um dos motivos que mais limitaram o número de excipientes que testei durante o desafio que me foi proposto.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Inclusão nas Reuniões de Projetos

Ao longo do meu estágio no Desenvolvimento de Formulação, fui contactando com os diferentes projetos, quer pelo acompanhamento do seu desenvolvimento no terreno, quer pelas reuniões de equipa onde eram abordados. Porém, ocorrem de forma regular reuniões de projetos, onde é feita uma atualização do seu estado, além de ser discutido e definido o futuro rumo do projeto, tanto internamente na empresa, como com clientes ou investidores.

Apesar do carácter confidencial destas reuniões, considero que a integração dos estagiários nas mesmas, iria proporcionar uma maior compreensão sob a forma pela qual a direção dos projetos é decidida, bem como possibilitar um maior conhecimento sob o modo como os dados devem ser apresentados e quais as conclusões que estes podem proporcionar.

2.3.2. Contacto com Outros Departamentos

Um dos pilares da inovação dentro da Bluepharma é o Desenvolvimento de Formulação. Todavia, uma empresa, sobretudo no setor farmacêutico, não depende apenas de um único departamento, mas sim da rede formada entre departamentos. Assim, o sucesso do Desenvolvimento de Formulação está condicionado pelo trabalho realizado noutros departamentos, como por exemplo no Desenvolvimento Analítico ou no Suporte ao Desenvolvimento de Formulação, cujas atividades impactam de forma direta o êxito do desenvolvimento de medicamentos genéricos.

Desta forma, acredito que o contacto com outros departamentos dentro da Bluepharma, tanto direta como indiretamente relacionados com o Desenvolvimento de Formulação, seria uma futura melhoria a considerar no plano de estágio definido. Esta interação, além de facultar uma perceção mais clara sob o trabalho realizado dentro de cada departamento, teria também a vantagem de impulsionar uma perspetiva mais alargada do contributo dos diferentes departamentos para o desenvolvimento de genéricos, além de permitir perceber, de que forma seria possível melhorar ou explorar este seu contributo.

2.4. Ameaças

2.4.1. Auditorias

Tendo em consideração o nível de regulamentação, associado à indústria farmacêutica, equipas de auditores tanto de agências regulamentares, como de clientes, visitam regularmente as instalações da Bluepharma, a fim de verificarem a sua conformidade com as diligências regulamentares. No entanto, com a restrição da mobilidade internacional, provocada pela

pandemia de COVID-19, estas auditorias ficaram limitadas à análise documental à distância, recorrendo a reuniões virtuais.

Com a recente estabilização da situação pandémica, o número de auditorias presenciais, outrora restritas, aos edifícios da Bluepharma escalou, o que levou à alteração da dinâmica de trabalho desta empresa, dada a necessidade de preparar as instalações para as equipas de auditores. Embora pequenas, estas mudanças condicionaram inevitavelmente a disponibilidade das equipas e o progresso dos projetos.

Desta forma, o vasto número de auditorias nas primeiras semanas de estágio, reduziram o potencial de aquisição de novos conhecimentos, devido à menor quantidade de testes de desenvolvimento da formulação realizados, mas também pelo progresso mais lento dos projetos e ainda pela menor disponibilidade de salas e equipamentos, sob auditoria.

2.4.2. Disponibilidade de Salas e Equipamentos

No que concerne ao desenvolvimento de genéricos, um dos requisitos fundamentais à realização de testes de formulação, relaciona-se com a disponibilidade das salas e equipamentos, adequadas ao trabalho a realizar.

Considerando a validação destas salas e equipamentos, necessária após os procedimentos de limpeza; a utilização dos mesmos equipamentos para o desenvolvimento de diferentes projetos; os cuidados de manutenção regulares e ainda a sua quarentena durante as auditorias, a sua disponibilidade é muitas vezes inferior ao desejável. Ao longo do meu percurso na Bluepharma, vivenciei por vezes, esta mesma barreira, algo que alargou os compassos de espera, para o início das atividades e que por sua vez, restringiu possivelmente, algumas das operações e testes, que poderia acompanhar.

3. Considerações Finais

Ao longo dos 3 meses de estágio na Bluepharma, vários foram os processos e fases do ciclo do medicamento, em particular de formas farmacêuticas sólidas, que tive o privilégio de acompanhar, permitindo-me não só aprender os conceitos básicos a qualquer profissional na indústria farmacêutica, como conhecer de perto, grande parte dos passos, processos e variáveis envolvidos no desenvolvimento de genéricos. Durante esta experiência curricular consegui também desenvolver competências, quer ao nível do planeamento e organização, quer ao nível da resolução de problemas e do pensamento crítico, as quais são um grande contributo à minha formação, como um dos possíveis membros deste grande setor.

Por fim, acredito que este estágio me proporcionou as ferramentas chave para conseguir intervir no ciclo do medicamento, especialmente na sua formulação, qualificando-me com as valências imprescindíveis à criação de valor e inovação na indústria farmacêutica.

4. Bibliografia

1. KHANNA, Ish - **Drug discovery in pharmaceutical industry: productivity challenges and trends**. *Drug Discovery Today*. 17:19–20 (2012), 1088–1102. doi: 10.1016/j.drudis.2012.05.007.
2. NUNES, Alexandre Morais *et al.* - **The Portuguese generic medicines market: What's next?**. *Health Policy*. 124:4 (2020), 397–403. doi: 10.1016/j.healthpol.2020.02.014.
3. SAHA, Atanu; ROBERTS, Heather - **Pharmaceutical industry's changing market dynamics**. *International Journal of the Economics of Business*. 27:2 (2020), 159–175. doi: 10.1080/13571516.2020.1752044.
4. American Association Of Colleges Of Pharmacy - **American Association of Colleges of Pharmacy: Graduating Student Survey 2018 National Summary Report**. Disponível na Internet em: <https://www.aacp.org/node/1710>
5. American Association Of Colleges Of Pharmacy - **American Association of Colleges of Pharmacy: Graduating Student Survey 2021 National Summary Report**. Disponível na Internet em: <https://www.aacp.org/node/2471>
6. BLUEPHARMA - **Bluepharma**. [Acedido a 25 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://www.bluepharmagroup.com/pt/sobre-nos/empresa>
7. PHADERMROD, Boonyarat *et al.* - **Importance-Performance Analysis based SWOT analysis**. *International Journal of Information Management*. 44 (2019), 194–203. doi: 10.1016/j.ijinfomgt.2016.03.009.
8. LONGHURST, Georga J. *et al.* - **Strength, Weakness, Opportunity, Threat (SWOT) Analysis of the Adaptations to Anatomical Education in the United Kingdom and Republic of Ireland in Response to the Covid-19 Pandemic**. *Anatomical Sciences Education*. 13:3 (2020), 301–311. doi: 10.1002/ase.1967.

5. Anexo

5.1. Anexo I



Figura I - Apresentação Final do Trabalho Experimental Desenvolvido na Bluepharma.

1 2 9 0



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Parte III

“Imunoterapia Ativa com Vacinas de mRNA para Tumores Sólidos: Abordagem de Neoantigénios”

Monografia elaborada sob orientação do Professor Doutor João Nuno Sereno de Almeida
Moreira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Abreviaturas

APC – Célula Apresentadora de Antígeno Profissional

Arg – Arginina

Breg – Célula B Reguladora

CLDN6 – Proteína Claudina-6

COVID-19 – Doença do Coronavírus

CTLA-4 – Antígeno 4 Associado a Linfócitos T Citotóxicos

DC – Célula Dendrítica

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

Gln – Glutamina

HLA – Sistema Antígeno Leucocitário Humano

IC – *Immune Checkpoint*

IDO – Indolamina 2,3-deoxigenase

IFN- γ – Interferão Gama

IgE – Imunoglobulina E

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

IL-2 – Interleucina 2

IL-6 – Interleucina 6

Indels – Inserções e Deleções

LAMP – Glicoproteína Associada à Membrana do Lisossoma

LNP – Nanopartícula Lipídica

MDSC – Célula Supressora Derivada Mieloide

MHC – Complexo Major de Histocompatibilidade

mRNA – RNA mensageiro

NeoAg – Neoantígeno

NF- κ B – Fator Nuclear κ B ou Fator de Transcrição κ B

NKC – Célula *Natural Killer*

PDI/LI – Proteína de Morte Celular Programada I/ Ligando I de Morte Celular Programada

Phe – Fenilalanina

RNA – Ácido Ribonucleico

RNA-LPX – RNA-Lipoplex

SAM-LNP – LNP com RNA Autorreplicante

SARS-CoV-2 – Síndrome Respiratória Aguda Grave - Coronavírus 2

Ser – Serina

shNeoAg – Neoantígeno Partilhado

shTAA – TAA Partilhado

SNV – Variação de Nucleótido Único

T CD4 – Linfócito T Auxiliar

T CD8 – Linfócito T Citotóxico

T eff – Linfócito T Efetor

TAA – Antígeno Associado ao Tumor

TADC – Célula Dendrítica Tumoral

TAM – Macrófago Tumoral

TAMC – Mastócito Tumoral

TEC – Célula Endotelial Tumoral

TFb – Fibroblasto Tumoral

TGF- β – Fator de Crescimento Tumoral β

TLR – *Toll-like receptor*

TME – Microambiente Tumoral

Treg – Linfócito T Regulador

TSA – Antígeno Específico do Tumor

Tyr – Tirosina

Val – Valina

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Resumo

Os tumores sólidos são uma das patologias de mais difícil sucesso terapêutico. As suas características imunossupressoras e o ganho de resistência são fatores complexos que condicionam a eficácia das terapêuticas existentes. Novas estratégias imunoterapêuticas têm sido desenvolvidas para solucionar esta limitação. Neste âmbito, a recente pandemia de SARS-CoV-2 permitiu aperfeiçoar a tecnologia de vacinação com mRNA e revelar o seu potencial terapêutico, em particular como imunoterapia antitumoral. Deste modo, vacinas de mRNA ambicionam agora revolucionar tanto o tratamento como a prevenção de tumores. A utilização de neoantígenos como alvos moleculares de vacinas de mRNA antitumorais, pretende aumentar a sua seletividade e melhorar o seu perfil de segurança, a caminho de uma medicina cada vez mais personalizada. Ao longo deste documento será explorado o desenvolvimento de vacinas de mRNA como estratégia imunotumoral. Assim será feita uma análise inicial dos diferentes grupos de antígenos tumorais, com destaque aos neoantígenos, seguindo-se uma breve descrição dos principais desafios em tumores sólidos e por fim serão exploradas as diferentes plataformas de vacinação, desde o início deste conceito até ao desenvolvimento de vacinas de mRNA.

Palavras-Chave: Imunoterapia; mRNA; Neoantígeno; Tumor Sólido; Vacina.

Abstract

Solid tumors are one of the most difficult pathologies for therapeutic success. Its immunosuppressive characteristics and cancer resistance mechanisms are complex factors that affect the effectiveness of existing therapies. New immunotherapeutic strategies have been developed to overcome this limitation. In this context, with the recent SARS-CoV-2 pandemic was possible to improve mRNA vaccination technology and reveal its therapeutic potential, with great emphasis as cancer immunotherapy. Thus, mRNA vaccines now aim at revolutionizing both the treatment and prevention of cancer. The use of neoantigens as molecular targets of anti-tumor mRNA vaccines aims to improve their selectivity and safety profile, on the way to personalized medicine. Throughout this document, we will explore the development of mRNA vaccines as a cancer immunotherapy strategy. First, we are going to analyze the different groups of tumor antigens, with emphasis on neoantigens, followed by a brief description of the main challenges in solid tumors, and finally, the different vaccination platforms will be explored, from the beginning of this concept to the development of mRNA vaccines.

Keywords: Immunotherapy; mRNA; Neoantigen; Solid Tumor; Vaccine.

I. Introdução

Tumores sólidos consistem numa massa de células maligna ou benigna, originada pela proliferação anômala.^{1,2} Estes tumores, aos dias de hoje, continuam a ser um grande desafio para estratégias terapêuticas. Enquanto que a incidência e mortalidade de doenças oncológicas se traduzem valores alarmantes, 19.292.789 novos casos e 9.958.133 mortes em 2020, a sua elevada heterogeneidade e o forte ambiente imunossupressor que lhes são característicos, condicionam as intervenções a utilizar.^{3,4,5}

Embora prevalentes, representando 90% dos casos oncológicos no continente norte-americano, os tumores sólidos contam com terapêuticas limitadas a intervenções cirúrgicas, quimioterapêuticas e radioterapêuticas como primeira linha de tratamento. Porém, estas abordagens tradicionais denotam eficácia e especificidade limitadas, sobretudo em estadios avançados do tumor.^{3,5}

Abordagens imunoterapêuticas têm-se revelado uma importante inovação neste campo. Imunoterapias baseadas em anticorpos, vetores virais, inibidores dos *immune checkpoints*, vacinas ou terapias celulares, são algumas das possíveis plataformas que em monoterapia ou em combinação, ambicionam modular o sistema imunitário, a fim de eliminar o tumor. Estas estratégias, têm permitido diminuir, de ano para ano, a mortalidade provocada por doenças oncológicas, alcançando melhores resultados clínicos.^{3,6,7,8}

Se até ao momento as imunoterapias já suportavam um melhor panorama anti-neoplásico, com as recentes descobertas podemos pensar num futuro ainda mais promissor. A pandemia de SARS-CoV-2 de 2019, permitiu divulgar e aperfeiçoar plataformas de vacinação de mRNA, as quais formaram o alicerce para as vacinas contra o COVID-19. O sucesso desta tecnologia de vacinação que, até então estava em desenvolvimento, nesta pandemia, destacou o seu potencial terapêutico, nomeadamente como imunoterapia em doenças oncológicas.^{9,10}

Assim, vacinas de mRNA antitumorais estão agora a ser otimizadas, com recurso à identificação de novos antígenos e à formulação com novos veículos de transporte, de forma a revolucionar tanto a terapêutica como a prevenção tumoral.^{5,9}

2. Mutações Tumoriais

As alterações genéticas são muito prevalentes em células neoplásicas, tendo o potencial de modificar quer a função, quer a expressão de proteínas. Estas mutações podem ter origem intrínseca ou extrínseca.¹¹

As mutações derivadas de fatores extrínsecos relacionam-se com a exposição a agentes mutagénicos, originando alterações ao nível do DNA. Agentes biológicos, químicos e

radiológicos, derivados da atividade antropogénica, ou produzidos de forma natural, são alguns dos fatores que podem dar início a estas mutações.¹¹

Causas intrínsecas, por outro lado, estão relacionadas a falhas nos mecanismos de replicação e reparação do DNA e a erros nas vias de regulação do ciclo celular. De acordo com o tipo de células em que se manifestam, estas alterações podem ser classificadas como somáticas ou germinativas. A acumulação destas alterações ao longo do tempo, proporciona o aparecimento de tumores, além de favorecer o seu crescimento, disseminação e a formação de mecanismos de evasão.^{11,12}

Tendo em conta a extensão do DNA afetada podem ser formadas mutações pontuais ou cromossomais.¹¹

Alterações genéticas pontuais envolvem a adulteração de uma reduzida porção de DNA, sendo o resultado de variações de nucleótidos únicas (SNVs), além de inserções e deleções nucleótidos (*Indels*) (**Figura 1**). SNVs, as mutações mais comuns, são formadas pela substituição de um par de bases. Este tipo de mutação possibilita a síntese de aminoácidos e sequências peptídicas diferentes, que podem dar lugar à alteração da função da proteína.^{11,13,14}

Sequências do genoma humano com um elevado número de repetições de timina e adenina, em contrapartida, são locais onde ocorrem mais *Indels*. Este tipo de mutações pode originar novos codões e como consequência alterar a região de leitura do gene, proporcionando uma sequência peptídica distinta e/ou a perda de função.^{11,12}

As mutações que alteram a região de leitura e eventos de *splicing* podem também originar mutações tumorais.^{15,16,17}

Por outro lado, o ganho, perda ou rearranjo da cromatina dentro do mesmo cromossoma ou entre cromossomas distintos, causam alterações estruturais. Com estas transformações cromossomais, ocorre a variação da posição, número, sequência ou ordem dos genes, originando possíveis alterações proteicas e/ou a alteração da quantidade de cromossomas.^{11,13,18}

3. Tipos de Antígenos Tumorais

Os antígenos produzidos em células tumorais, são potenciais alvos para imunoterapias. Tendo em conta a sua expressão tanto em células neoplásicas, como em células sãs, estes antígenos podem ser divididos em duas classes distintas.¹⁹

A primeira classe, os antígenos associados ao tumor (TAAs) são expressos de forma seletiva e/ou em grande densidade no tumor, dado a possível origem em processos de diferenciação tumoral. Porém, TAAs estão também presentes em células saudáveis.^{19,20}

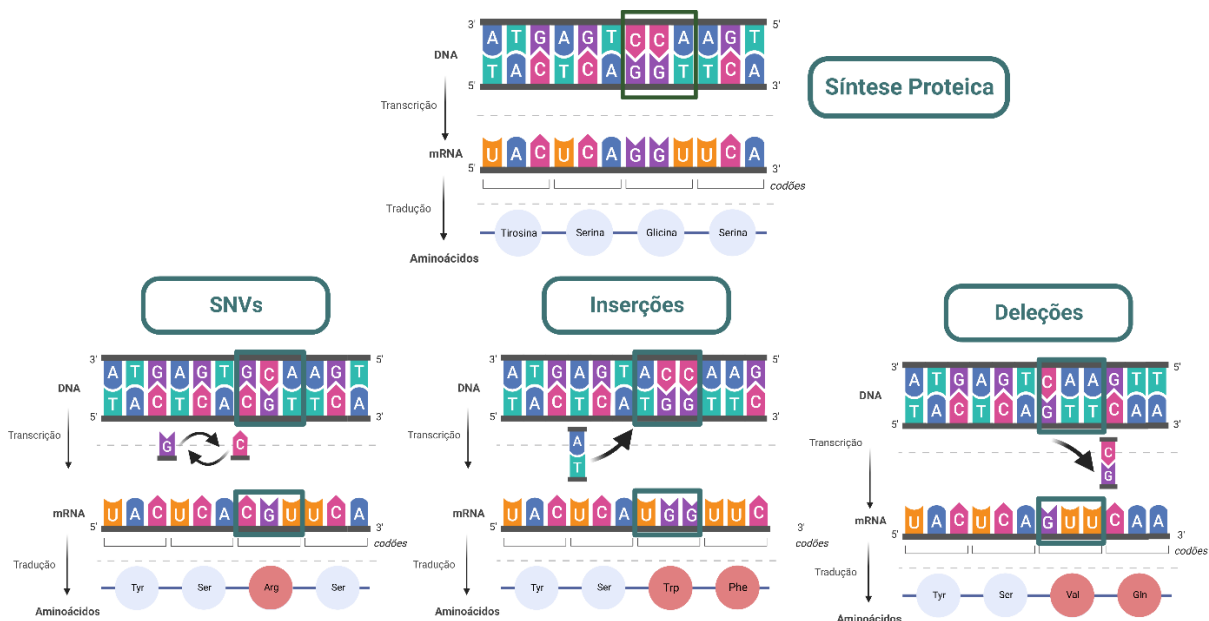


Figura 1 – Mutações Tumorais: Algumas das mutações que dão origem a antígenos tumorais consistem em variações de nucleótido único (SNVs), inserções e deleções que, ao alterarem a sequência peptídica traduzida, formam proteínas diferentes ou disfuncionais. Criado com BioRender.²¹ (Adaptado de Lang, Franziska *et al.*¹⁷) Abreviaturas: Arg – Arginina; Gln – Glutamina; Phe – Fenilalanina; Ser – Serina; Tyr – Tirosina; Val – Valina; SNVs – Variações de Nucleótido Único.

Esta falta de especificidade na expressão celular dos TAAs, providencia a sua suscetibilidade a mecanismos de tolerância central, pelos quais linfócitos autorreativos são eliminados ou anergizados. Estes mecanismos condicionam assim a imunogenicidade dos TAAs, dificultando a indução de respostas anti-neoplásicas robustas.^{20,22}

De forma oposta, a classe dos antígenos específicos tumorais (TSAs), derivam do conjunto de mutações único das células neoplásica, pelo que diferem estruturalmente de autoantígenos. Esta classe de neoepítopos é exclusivamente encontrada em tecidos tumorais pelo que, a sua imunogenicidade não é afetada por mecanismos de tolerância central.²² Apesar da elevada capacidade imunogénica, a baixa semelhança com antígenos endógenos e a sua expressão seletiva, os TSAs nem sempre são reconhecidos pelas células do sistema imunitário.^{20,22}

4. Neoantígenos

Nas células tumorais, as mutações somáticas, podem proporcionar à célula, um novo conjunto de proteínas únicas, não existentes em células saudáveis.^{17,23,24}

As novas proteínas geradas podem ser expressas à superfície das células tumorais, no entanto, apenas uma reduzida porção das mutações é apresentada no Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC). Para que os TSAs, sejam expressos na superfície da célula, é

necessário que sejam processados e apresentados como epítomos no MHC ou Sistema Antígeno Leucocitário Humano (HLA), sendo designados – neoantígenos.^{17,23,24,25}

O HLA é muito heterogêneo entre indivíduos, além de suscetível a mutações. Desta forma, imunoterapias baseadas em neoantígenos que pretendam induzir uma resposta antitumoral, necessitam de neoepítomos que correspondam ao HLA do doente.¹³

O conjunto de mutações num indivíduo designado por – mutanoma, é variável. No entanto, apenas 1 a 2% destas alterações genéticas originam neoantígenos reconhecidos por células T. Destes, nem todos conseguem induzir um efeito antitumoral ou mediar mecanismos de imunidade celular.^{17,26}

Dada a sua localização privilegiada, a sua capacidade para superar mecanismos imunes de tolerância central e a sua estrutura *non-self*, os complexos neoepítomo-MHC são reconhecidos por linfócitos T, principalmente T CD4 e T CD8. Desta interação, resultam respostas anti-neoplásicas imunes. Assim, são considerados alvos seguros e potentes para estratégias imunoterapêuticas, em particular, estratégias baseadas em células T.^{17,23,27}

A natureza destes antígenos tumorais tem sido extensamente estudada, no intuito de melhor compreender o diferente número e tipo de neoantígenos expressos no Homem. Tenciona-se igualmente perceber qual o papel da densidade de neoepítomos presentes no tumor, para a performance da terapêutica utilizada, bem como, compreender a capacidade da pressão seletiva, derivada dos mecanismos imunitários do doente, ou induzida terapêuticamente, para alterar a gama de epítomos expressa.²³

4.1. Classe de Neoantígenos

Cada doente apresenta um conjunto único de neoantígenos – o neoantigenoma, podendo estes serem divididos em diferentes categorias, de acordo com: o tipo de mutação, a sua relevância clínica e a sua heterogeneidade.^{17,25}

4.1.1. Tipo de Mutação

Este tipo de classificação faz a distinção entre os diferentes antígenos tumorais, pelas mutações que lhes dão origem e que definem as suas propriedades moleculares.¹⁷

Entre os diferentes tipos de mutações, as SNVs são o grupo mais bem estudado na clínica, sendo caracterizadas com um maior grau de similaridade com auto-antígenos. Por outro lado, mutações que alteram a região de leitura do gene, como *Indels*, fusões de genes, *splicing* e rearranjos genéticos, estão associadas a antígenos tumorais estruturalmente menos semelhantes a antígenos endógenos. Dado que, estruturas com menor grau de similaridade

denotam um reconhecimento facilitado, mutações que alteram a região de leitura, são menos afetadas pelos mecanismos de tolerância imunológica e são mais imunogênicas. Assim, *Indels*, fusões de genes, *splicing* e rearranjos genéticos são candidatos, pouco explorados, a possíveis fontes de novos neoantígenos.^{17,23,25}

4.1.2. Relevância Clínica

A preponderância de cada tipo de neoantígeno, no contexto clínico, varia tendo em consideração a história clínica, os mecanismos de imunidade que desencadeia e o impacto no ciclo oncológico. Assim, os neoantígenos podem ser divididos em: Neoantígenos Sentinela, Neoantígenos Silenciados e Neoantígenos Ocultos.¹⁷

4.1.2.1. Neoantígenos Sentinela

São antígenos formados de forma espontânea e de difícil identificação no Homem. A sua expressão é por si só, suficiente para induzir respostas imunitárias significativas.¹⁷

Estes neoantígenos foram propostos como mediadores da eliminação tumoral, numa fase do ciclo da doença precoce, isto é, antes de existirem manifestações clínicas. Além da sua ação prévia, a sua função sentinela pode também estar envolvida com o seu potencial para, após intervenção cirúrgica, reduzirem o crescimento tumoral, impedirem a formação de metástases e prevenirem reincidências. Estes neoepítomos podem assim gerar uma resposta antitumoral forte, devido à elevada afinidade de ligação a moléculas MHC, à formação de complexos estáveis, ou ainda por mecanismos de reatividade cruzada com linfócitos previamente ativados contra outros antígenos (vírus, bactérias, microbiota).¹⁷

4.1.2.2. Neoantígenos Silenciados

Este tipo de estruturas ocorre naturalmente, como resultado da expressão de SNVs, mutações que alteram a região de leitura ou fusões genéticas.¹⁷

Neoantígenos silenciados apresentam uma imunogenicidade mais limitada, originando uma expansão clonal insuficiente ou a anergia de células T. Linfócitos T ativados por estes neoantígenos, presentes na superfície de células cancerígenas ou células apresentadoras de antígenos (APCs), promovem a supressão tumoral. Todavia a sua ação é mitigada quer pelo rápido crescimento, quer pelo microambiente tumoral (TME).¹⁷

4.1.2.3. Neoantígenos Ocultos

As células T naive necessitam de elevados níveis de apresentação de antígenos para serem ativadas. Os neoantígenos ocultos são expressos em reduzida quantidade, à superfície

de células neoplásicas. Dado não alcançarem o limiar de ativação dos linfócitos T naive, os neoantígenos ocultos, ao contrário do que ocorre com neoantígenos sentinela e neoantígenos silenciados, não apresentam capacidade imunogénica espontânea. Apesar destas moléculas não proporcionarem, por si só, a ativação de linfócitos T naive, são reconhecidas por células T memória, auxiliando os processos de rejeição tumoral.¹⁷

4.1.3. Heterogeneidade

O mutanoma de cada doente é único e como tal também o seu neoantigenoma, porém, existem antigénios que podem ser partilhados entre indivíduos com a mesma patologia oncológica. Com base neste conceito, podemos classificar os neoantígenos como partilhados ou personalizados, consoante sejam identificados em doentes com o mesmo tumor ou difiram de doente para doente, respetivamente.²⁵

4.2. **Papel dos Neoantígenos na Resposta Imunitária**

A presença destas pequenas sequências peptídicas de natureza tumoral, veste um papel crucial para o desenvolvimento de respostas antitumorais específicas, capazes mediar a rejeição tumoral. No entanto, nem todos os neoantígenos são capazes de desencadear mecanismos imunes. A imunogenicidade dos neoantígenos é umas suas características mais importantes. Para que um neoantígeno seja imunogénico é necessário que seja processado eficazmente no proteossoma, de forma a ser posteriormente transportado na forma de péptidos para o retículo endoplasmático. Aqui, deverá apresentar uma elevada afinidade de ligação a moléculas MHC, com as quais deve formar complexos estáveis. Estes complexos serão transportados para a superfície celular, de modo a possibilitar a apresentação do neoepítipo que terá, por último, de interagir de forma estável com recetores dos linfócitos T, para induzir uma resposta imunitária robusta.^{17,28,29}

5. **Imunoterapia: Desafios em Tumores Sólidos**

Os tumores sólidos, além de heterogéneos, são capazes de expressar uma ampla gama de neoantígenos, o que dificulta o seu reconhecimento por linfócitos T, constituindo um grande desafio à eficácia de imunoterapias.^{30,31}

Neste tipo de neoplasias a presença de uma matriz de características fibróticas, em conjunto com a desregulação da síntese de fatores vasculares e quimiocinas são outro obstáculo a superar, dado limitarem o fluxo de células imunes ao tumor.^{30,31}

No entanto, o TME é talvez a barreira mais importante de tumores sólidos. Formado por um grande infiltrado de células e pelo tecido tumoral, este microambiente tem propriedades imunossupressoras e angiogénicas, que impulsionam o ganho de resistência, a evolução tumoral e a disseminação do tumor.^{30,31,32}

Dentro do TME são também encontradas, grandes quantidades de citocinas, quimiocinas, moléculas angiogénicas e fatores de crescimento. Estes últimos promovem a progressão do tumor, pela formação de uma rede de vasos aberrante, condicionando não só o aporte nutricional e de oxigénio às células presentes neste local, mas também o fluxo de células imunitárias ao tumor.^{31,33}

O estado hipóxico em certas zonas do tecido tumoral, devido à ausência de vasos sanguíneos ou dada a elevada concentração de células, provoca o aumento de fatores pro-angiogénicos e limita tanto a proliferação, como a atividade de células T. A escassa quantidade de oxigénio, aumenta o ácido láctico e as espécies reativas de oxigénio, pela ativação da via glicolítica em células tumorais. Em pH ácido ou sob a pressão do stress oxidativo, as respostas antitumorais são inibidas.^{31,33}

A carência de glucose e aminoácidos, nutrientes essenciais à atividade de linfócitos T, devido à vasculatura aberrante ou à atividade de enzimas catabólicas, levam também à anergia destas células de defesa, destacando uma vez mais a importância do TME, como barreira a imunoterapias antitumorais.³¹

5.1. Imunomodulação/Imunoedição

O equilíbrio entre o crescimento tumoral e as respostas imunitárias antitumorais dá origem ao processo de imunomodulação. Este é constituído por 3 fases sequenciais: eliminação, equilíbrio e escape tumoral.^{34,35}

Na primeira fase, as células tumorais são eliminadas pelo sistema imunitário (inato e adaptativo), no entanto, pode não ocorrer uma eliminação completa. Assim, uma pequena porção de células neoplásicas fica disponível para avançar para a fase seguinte.^{34,35}

Já na etapa de equilíbrio, há uma harmonia entre as respostas antitumorais e os mecanismos mutacionais, levando à formação de novas variantes tumorais, ou seja, clones de células tumorais com características distintas entre si.^{34,35}

Por fim, o de escape tumoral é alcançado quando, devido à exaustão do sistema imunitário, motivado pelo contacto crónico com os antígenos, são desenvolvidas vias de evasão tumoral, como mecanismos imunossupressores e/ou de resistência. No decorrer desta fase, o equilíbrio é notoriamente deslocado a favor do crescimento tumoral.^{34,35}

5.2. Estratégias de Evasão Tumoral

Ao longo do ciclo de vida do tumor, o mutanoma está em constante mudança originando, por vezes, clones resistentes. A pressão seletiva imposta pelas respostas imunitárias existentes, induzidas ou reforçadas pela imunoterapia, favorecem a formação de estratégias tumorais que visam limitar respostas inflamatórias e imunitárias, em prole da sobrevivência e evolução do tumor. Desta forma, verifica-se o crescimento de células aberrantes, cujas mutações conferem resistência aos mecanismos de defesa anti-neoplásicos.^{28,36}

São várias as estratégias de evasão exploradas pelos tecidos tumorais. Destas podemos identificar a produção de mediadores pro-tumorais; a alteração da maquinaria de apresentação de antígenos; a perda de material genético ou proteico (responsável pelo reconhecimento destas células pelo sistema imune); a produção de novas moléculas que asseguram vantagens competitivas às células cancerígenas; a ausência de fatores co-estimuladores e a expressão de fatores anti- ou pro-apoptóticos, direcionados para células tumorais ou para linfócitos T.^{19,35}

5.3. Imunossupressão Tumoral

A interação entre células imunes e os constituintes do microambiente tumoral, um dos principais mecanismos de imunossupressão, modula negativamente o sistema imunitário e favorece progressão tumoral. Esta modulação pode ser alcançada tanto pela atração de células imunorreguladoras, como pela libertação de moléculas inibitórias e a indução da expressão de *Immune Checkpoints* (ICs).³⁶

5.3.1. Sobreexpressão de *Immune Checkpoints*

Immune checkpoints (ICs), são recetores, presentes à superfície de células B, linfócitos T, células *natural killer* (NKC) e outras células imunitárias capazes de regular o sistema imunitário. Ao serem ativados, suprimem respostas imunitárias, estimulam a apoptose e suportam mecanismos de tolerância periférica.^{31,36}

A ativação de um *immune checkpoint* promove o aumento da expressão destes recetores nas células do sistema imunitário, convergindo na sua disfunção e na criação de mecanismos de resistência. Componentes do TME, em especial células tumorais, expressam grandes quantidades de agonistas dos ICs que, ao interagir com os seus recetores aumentam o número de ICs em células imunes do infiltrado tumoral.^{35,36}

Inibidores de ICs em conjunto com moléculas capazes de impedir a interação agonista-recetor têm sido apontados como uma das possíveis estratégias para prevenir a resistência tumoral e melhorar a eficácia de imunoterapias.^{35,36}

5.3.2. Células Imunossupressoras

No TME, acumulam-se células moduladoras da resposta imune, como linfócitos T reguladores (T regs), células B reguladoras (Bregs) macrófagos tumorais (TAMs), células supressoras derivadas mieloides (MDSCs), mastócitos tumorais (TAMCs), células dendríticas tumorais (TADCs), células endoteliais tumorais (TECs) e fibroblastos tumorais (TFbs).³⁶

Estes aglomerados, em sinergia com as células tumorais, libertam mediadores químicos como quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento e enzimas, além de expressarem moléculas inibitórias (**Figura 2**). O conjunto destes mecanismos dá origem ao TME, além de promover o crescimento tumoral e o desenvolvimento de metástases.³⁶

5.3.2.1. Células Tumorais

Estas células neoplásicas, estão em constante mudança, proporcionando o desenvolvimento de estratégias que lhes permitem aumentar a sua sobrevivência, escapar a mecanismos antitumorais e inibir estes mesmos mecanismos. Contam também com um genoma e um proteoma únicos, além da capacidade para introduzir modificações proteicas pós-tradução, condicionando não só as sequências peptídicas expressas, como também a sua apresentação na superfície celular.^{19,32}

Dado o seu papel chave para a construção de um microambiente tumoral imunossupressor, as células tumorais expressam grandes quantidades de citocinas pró-tumorais, como a interleucina 10 (IL-10) e o fator de crescimento tumoral β (TGF- β).^{14,22,32}

A IL-10, está envolvida em mecanismos de desregulação da expressão de moléculas MHC classe I e II em células tumorais, diminuindo a ativação de respostas imunitárias e suportando a formação de MDSCs e a redução da maturação de APCs. A atividade, proliferação e diferenciação de linfócitos T efetores (Teffs), juntamente com a produção de citocinas anti-neoplásicas são igualmente condicionadas por esta interleucina.^{32,35,36}

De entre as citocinas que mais contribuem para o TME está o TGF- β , uma molécula que ao ligar aos seus recetores em células imunitárias, leva à inibição da síntese de IL-2, à diminuição da ativação e da expansão clonal de células T CD8, à supressão da formação de células memória e à alteração dos grânulos de linfócitos T citotóxicos.^{32,36}

O aumento dos níveis extracelulares de adenosina, outra das vias de escape explorada por estas células, permite suprimir a atividade de linfócitos Teffs e favorecer a proliferação de linfócitos T reguladores (Tregs), por um mecanismo de *feedback* positivo.^{30,37}

A composição enzimática é outro fator importante. Tecidos neoplásicos, contém elevadas quantidades de cicloxigenase-2 e de prostaglandina E2, o seu metabolito. Estas duas moléculas influenciam negativamente mecanismos de imunidade celular, uma vez que alteram o perfil de citocinas libertadas por células T CD4, potenciando o aporte de MDSCs, induzindo a produção de IL-10 e desregulando a produção de IL-12 e IFN- γ . Uma segunda enzima é igualmente expressa em grandes quantidades, a indolamina 1,3-dioxigenase (IDO), a qual consegue mediar a apoptose de linfócitos T e levar à depleção dos níveis de triptofano, convertendo-o em metabolitos tóxicos para células T. O triptofano é essencial à atividade de células T, pelo que concentrações baixas deste aminoácido estão envolvidas na anergia destes linfócitos.³²

Adicionalmente, células tumorais conseguem impedir a ação citotóxica de linfócitos T CD8, além de secretarem tanto quimiocinas capazes de induzir o aporte de células Treg ao tecido tumoral, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que contribui para o processo angiogénico.^{14,32}

5.3.2.2. Células T Reguladoras

Os linfócitos Tregs, são um subtipo de células T CD4 originadas no timo e responsáveis por mecanismos de tolerância periférica. Estas células estão presentes em grande número em várias neoplasias, estando associadas a um mau prognóstico.^{35,36,38}

Os linfócitos Treg opõem-se a mecanismos imunitários antitumorais quer a nível sistémico, quer localmente no tecido tumoral, culminando na perda de eficácia ou mesmo no ganho de resistência à terapêutica.^{35,36,38}

Estes linfócitos são altamente imunossupressores, estando associados à libertação de TGF- β e IL-10. São igualmente responsáveis pelo consumo de IL-2, pelo aumento extracelular de adenosina e pela indução da expressão de ICs (como a CTLA-4 e o PD-1) em células imunes. O conjunto destes mecanismos limita a ativação e a expansão clonal de linfócitos T CD4 e T CD8, constituindo um obstáculo à eficácia de imunoterapias.^{32,36,37,39}

Agonistas do recetor ativador do NF-kB e VEGF, são também expressos por células Tregs e, ao interagirem com os seus recetores à superfície de células tumorais e endoteliais, potenciam a proliferação de linfócitos Treg e a angiogénese, respetivamente.^{30,32,40}

5.3.2.3. Células B reguladoras

O papel e o impacto das Bregs no TME são temas emergentes e não consensuais. Entende-se que estas células no infiltrado tumoral possam inibir linfócitos T CD4 e T CD8, recorrendo à libertação de citocinas como a IL-10 e à expressão de ligandos dos ICs, limitando assim a resposta antitumoral.³⁶

5.3.2.4. Macrófagos Tumorais

Tumores sólidos apresentam infiltrados celulares com elevada densidade de TAMs, um dos tipos de células que mais contribui para os mecanismos imunossupressores do TME.³⁰

Estas células na sua forma M2, isto é, ativadas, sintetizam IL-10, expressam agonistas de ICs e produzem metaloproteínases, responsáveis por induzir a expansão tumoral. Os TAMs promovem também o crescimento tumoral recorrendo à formação de novos vasos, induzida pela libertação de VEGF.^{31,32,36}

5.3.2.5. Células Supressoras Derivadas Mieloides

Este conjunto de células heterogéneas, originadas pela diferenciação de células mieloides da medula óssea, infiltram-se no tecido tumoral, contribuindo para a atividade imunossupressora no TME. Assim, o crescente número de MDSCs no infiltrado tumoral, relaciona-se com um mau prognóstico.^{14,36}

A ativação das MDSCs ocorre no TME, pelo contacto com citocinas e fatores de crescimento, libertados por células tumorais ou por linfócitos T.^{35,36}

Após ativação, estas células atuam essencialmente pelo aumento da conversão de Teffs em Treg, pela ampliação da relação Treg: Teffs, pela indução da produção de mediadores inflamatórios e pelo estímulo de enzimas (como a arginase). Além destes mecanismos, impedem, respostas de células T CD8, suprimem a ativação de NKC e limitam o aporte e proliferação de células T ao microambiente tumoral.^{35,36}

Mediadores imunossupressores, fatores pro-tumorais e fatores angiogénicos como a IL-10, o TGF- β , VEGF eIDO são algumas das moléculas libertadas pelas MDSCs.^{30,36}

5.3.2.6. Mastócitos Tumorais

São células que migram para o tecido tumoral pela libertação de agentes quimiotáticos (como o VEGF), por componentes do sistema imune ou do TME.^{36,41}

No entanto, para passarem a desempenhar a sua função têm de ser ativados pela interação com imunoglobulinas E (IgEs), pelo ambiente hipóxico, ou pelo contacto com infiltrados de células imunitárias e agonistas dos *toll-like receptors* (TLRs).³⁶

Já no tecido tumoral e mediante ativação, os TAMCs são capazes de impulsionar a proliferação e evasão tumoral, induzir a formação de metástases, potenciar a angiogénese e dar suporte a mecanismos de imunossupressão. Para alcançar estas alterações, os TAMCs libertam IL-10, TGF- β , VEGF e outros fatores pro-tumorais, além de enzimas proteolíticas.^{36,41}

5.3.2.7. Células Dendríticas Tumorais

Como parte das APCs, as células dendríticas (DCs) são especializadas na apresentação de antígenos e na ativação de mecanismos de resposta imunitária. Porém, DCs, presentes no microambiente tumoral sofrem uma alteração fenotípica progressiva, podendo tanto ativar, como limitar respostas imunitárias pela indução ou inibição de linfócitos T CD8 e Teffs.^{31,36}

Pela libertação de IL-10 e TGF- β , ou pela expressão de agonistas dos ICs e de grandes quantidades de IDO, estas células estão envolvidas na imunomodulação. A IDO é uma enzima inibitória que regula a atividade de células T e altera o conteúdo dos grânulos destes linfócitos, tendo também a capacidade de propagar a sua expressão a DCs IDO(-) vizinhas.³⁶

Para além da sua atividade imunossupressora direta, a IDO potencia ainda a conversão de linfócitos Teffs em células Treg que, por sua vez, aumentam a expressão desta enzima nas TADCs pela interação com ligandos de ICs, num mecanismo de *feedback* positivo.³⁶

As TADCs estão igualmente relacionadas com a plasticidade tumoral, com a formação de neovasos, com alterações genéticas e proteicas e com o crescimento tumoral e sua disseminação. Deste modo, as TADCs têm um importante papel na evolução e expansão da massa tumoral.³⁶

5.3.2.8. Células Endoteliais e Fibroblastos Tumorais

No infiltrado tumoral é também possível encontrar células que não pertencem ao sistema imunitário e que dão suporte a mecanismos de evasão, crescimento tumoral e imunossupressão, como TFbs e TECs.³⁶

As TECs, identificáveis pela sua forma e morfologia peculiares, promovem a formação de novos vasos sanguíneos, fornecendo suporte ao crescimento e à disseminação do tumor.³⁶

Já os TFbs, formados em condições de hipóxia, são responsáveis pela degradação da matriz extracelular e pela morte celular programada de linfócitos T CD8. Detêm ainda a capacidade para impulsionar o crescimento tumoral, a angiogénese e a formação de metástases, além de promoverem a impermeabilidade tumoral a células do sistema imunitário.^{31,36}

6. Imunidade Ativa e Imunidade Passiva

Historicamente, o conceito de imunidade ativa encontra-se associado à estimulação de respostas imunitárias pelo organismo hospedeiro, potenciando a formação de memória imunológica. De outra forma, a imunidade passiva visa fornecer componentes imunológicos como células T ou anticorpos, para dar resposta a uma dada patologia.⁴²

No entanto, com o avançar das abordagens terapêuticas, o desenvolvimento de imunoterapias que atuam tanto pelo aporte de células imunitárias ao hospedeiro, como pela estimulação de respostas antitumorais, estreitou a distinção entre estes dois tipos de imunidade.⁴²

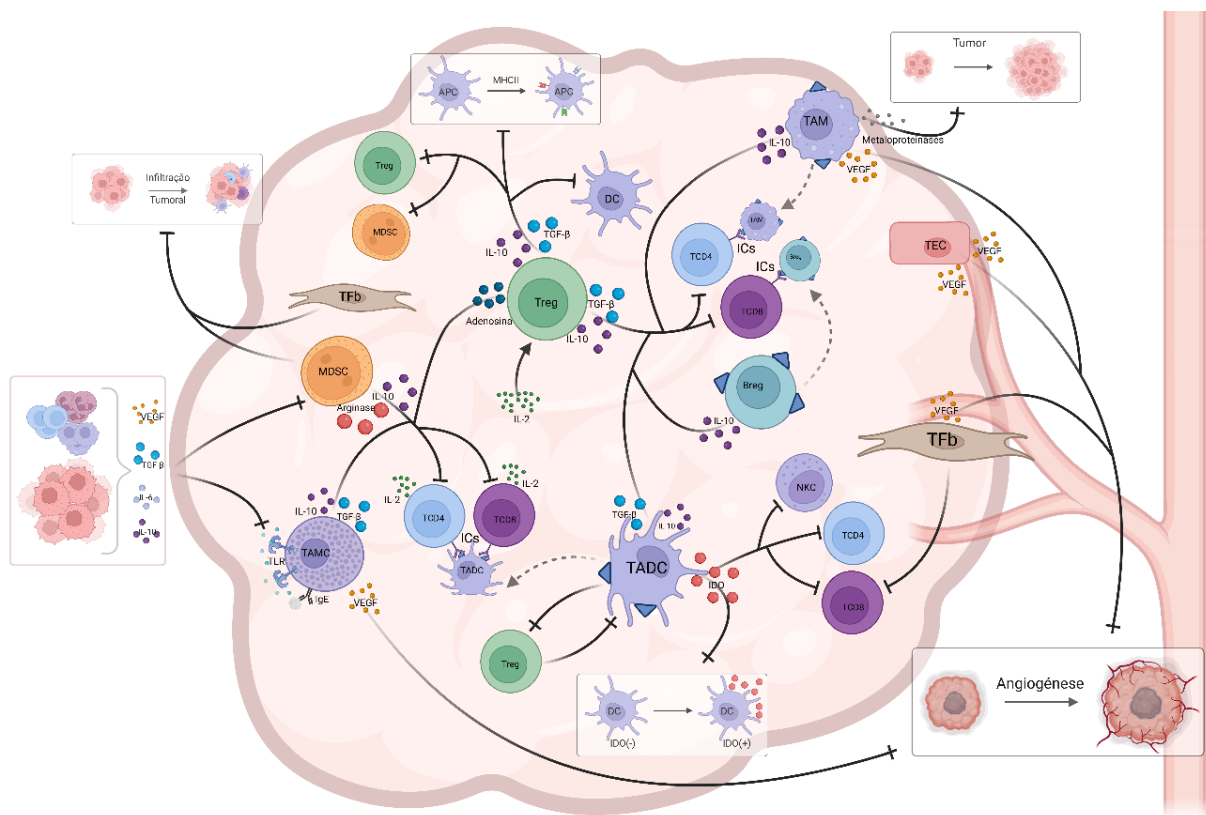


Figura 2 – Microambiente Tumoral: o TME característico de tumores sólidos é constituído por uma grande massa de células com propriedades imunorreguladoras. O conjunto destas células liberta citocinas e fatores angiogênicos pro-tumorais que não só inibem a atividade do sistema imunitário, como dão origem a uma vasculatura anormal que condiciona o aporte de oxigénio e nutrientes, essenciais à atividade de linfócitos T. Criado com BioRender.²¹ (Adaptado de Piñeiro Fernández, Julián *et al.*⁴³; Zhang, Jun e Veeramachaneni, Nirmal.⁴⁴)
Abreviaturas: APC – Célula Apresentadora de Antígenos Profissional; Breg – Célula B Reguladora; ICs – Immune Checkpoints; IDO – Indolamina 2,3-deoxigenase; IgE – Imunoglobulina E; IL-10 – Interleucina 10; IL-2 – Interleucina 2; IL-6 – Interleucina 6; MDSC – Célula Supressora Derivada Mieloide; MHC – Complexo Major de Histocompatibilidade; NKC – Célula Natural Killer; T CD4 – Linfócito T Auxiliar; T CD8 – Linfócito T Citotóxico; TADC – Célula Dendrítica Tumoral; TAM – Macrófago Tumoral; TAMC – Mastócito Tumoral; TEC – Célula Endotelial Tumoral; TFb – Fibroblasto Tumoral; TGF-β – Fator de Crescimento Tumoral β; Treg – Linfócito T Regulador; VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular.

6.1. Imunidade Passiva

Estratégias terapêuticas de imunidade passiva são principalmente aplicadas em doentes terminais, essencialmente devido ao comprometimento do sistema imunitário ou a uma reduzida esperança média de vida.⁴²

Assim, a utilização deste tipo de tratamento, não depende da integridade dos mecanismos antitumorais do doente, o que possibilita a construção de uma resposta anti-neoplásica, sem a necessidade de um estímulo primário.¹⁴

6.2. Imunidade Ativa

A noção de imunidade ativa surgiu, a par com técnicas de vacinação profilática ou terapêutica. Esta estratégia requer um sistema imune íntegro, de forma a permitir a ativação de mecanismos de defesa, mediados por anticorpos e por linfócitos T, direcionados contra células tumorais.⁴²

Dentro de estratégias de imunidade ativa as terapêuticas pressupõem uma elevada especificidade, para mitigar os potenciais riscos de doenças autoimunes. A sua dose é também condicionada pelo sistema de veiculação escolhido.⁴²

A vacinação raramente é efetiva por si só, pelo que estas terapêuticas estão geralmente dependentes da utilização de adjuvantes.⁴²

7. Vacinas Antitumorais

A utilização de vacinas como estratégia terapêutica antitumoral, remonta à data de 1890 com o trabalho de William B. Coley, o qual administrou sucessivas injeções de uma toxina bacteriana, num doente com sarcoma, alcançando a regressão tumoral.^{45,46}

Vários anos se passaram, até que, na década de 80, foi desenvolvida uma nova vacina assente na administração de células de cancro colorretal, juntamente com bacilos *calmette-Guerin* (BCG) e para a qual foi demonstrada uma moderada eficácia clínica. No entanto, apenas em 2010 foi aprovada, pela *Food and Drug Administration* (FDA), a primeira vacina antitumoral a – Provenge, baseada na administração de células dendríticas no cancro da próstata. Com esta aprovação teve início uma nova era onde as vacinas antitumorais tomam lugar como possíveis estratégias terapêuticas a utilizar.^{47,48,49}

Várias vacinas tumorais surgiram, como forma de potenciar ativamente tanto mecanismos de imunidade celular, como humoral, visando gerar novas respostas antitumorais e otimizar as já existentes. Porém, a viabilidade destas vacinas depende da robustez das

respostas geradas e define-se pela capacidade para alcançar uma imunidade duradoura e eficaz.^{20,22}

Atualmente, diversos esforços têm sido feitos no sentido de produzir novas vacinas, com maior eficácia, destinadas a serem aplicadas em tumores primários e/ou metástases.^{20,50}

7.1. Alvos Moleculares

Desde a sua descoberta, o maior desafio para o desenvolvimento de vacinas antitumorais, relaciona-se com a falta de alvos moleculares específicos.^{19,20}

Idealmente estratégias imunoterapêuticas antitumorais visam ter como alvo, moléculas unicamente expressas em células neoplásicas, que sejam partilhadas entre doentes com a mesma condição oncológica e cuja expressão se mantenha ao longo do tempo. Com este ponto de vista, mutações em genes *driver* assumem-se como possíveis alvos ideais. Estes genes são essenciais ao tumor, conferindo vantagens competitivas para a sobrevivência tumoral. Sabe-se também que mutações *driver* são partilhadas mais frequente entre subpopulações de doentes, além de que são menos suscetíveis a mecanismos de escape tumoral, essencialmente devido à importância da mutação para a subsistência tumoral. Embora sejam potenciais alvos terapêuticos, a sua raridade e baixa imunogenicidade, podem limitar, em alguns casos, a sua aplicabilidade. Em conjunto com a falta de consenso sobre a capacidade da mutação *driver* para interagir com moléculas MHC, estas características são potenciais obstáculos à utilização destas mutações como alvos moleculares de eleição.^{17,51,52}

Apesar do relevo de mutações *driver*, a maioria dos neoantígenos derivam de mutações em genes passageiros, ou seja, mutações em regiões genéticas que conferem poucas ou nenhuma vantagem à sobrevivência tumoral. É para mutações em genes “passageiros” que também se denota uma maior reatividade imunitária, podendo esta ser uma consequência da sua menor suscetibilidade a mecanismos de imunomodulação, assegurando assim a sua expressão ao longo do tempo. Deste modo, neoantígenos derivados de mutações passageiras, têm também sido explorados como potenciais alvos.^{17,23}

Novas técnicas de sequenciação, rápidas e com uma boa relação de custo-performance, juntamente com a criação de algoritmos bioinformáticos que possibilitam, não só a identificação de epítomos tumorais, mas também a sua caracterização em termos de afinidade de ligação a moléculas MHC, estabilidade do complexo formado e capacidade de interação com recetores superficiais de linfócitos T, possibilitaram a criação de vacinas baseadas em TAAs e TSAs, com maior especificidade.^{14,20,53,54}

Embora a maioria das vacinas em ensaios clínicos seja direcionada contra TAAs, a preocupação com a perda de eficácia devido a mecanismos de tolerância imunológica e o risco

de autotoxicidade, destacam as vantagens de uma possível abordagem direcionada contra neoantígenos, apesar da sua raridade.^{20,50,54}

7.2. Vacinas de Células Tumorais

Em 1978, com o trabalho desenvolvido por Hann *et al.*, foi publicada a primeira vacina baseada em células tumorais. Esta estratégia de vacinação usou como base a administração de células tumorais do doente, previamente colhidas, sujeitas a um processo de crescimento *in vitro* sob possível manipulação genética e finalmente infundidas com o auxílio de adjuvantes ou partículas virais, para aumentar a sua imunogenicidade.^{22,55,56,57}

A disponibilidade destas células e o seu potencial para expressarem toda a gama de TAAs, foram motivos que estiveram na base do desenvolvimento destas vacinas. Adicionalmente, a administração de células tumorais autólogas, não é limitada pelo tipo de HLA do doente. Contudo, dada a apresentação de um grande número de antígenos, estas vacinas contam com a maior capacidade imunogénica e a menor especificidade.^{22,56,58}

Após o seu desenvolvimento, vários estudos foram realizados de forma a perceber a sua performance terapêutica. Embora os resultados preliminares evidenciassem uma boa tolerância e a ausência de efeitos secundários severos, a eficácia desta terapêutica não correspondeu ao esperado. Num esforço para melhorar este desempenho, técnicas de manipulação genética foram aplicadas, visando induzir a expressão de citocinas antitumorais em células neoplásicas, porém apenas uma ligeira melhoria foi visível.⁵⁶

Além dos resultados clínicos desviantes, a falta de especificidade e a grande dificuldade tanto para controlar a variabilidade, como para assegurar o cumprimento com requisitos legais de qualidade, em conjunto com a difícil conservação de culturas celulares, o extenso trabalho laboratorial e os grandes custos de produção, são barreiras ao sucesso das vacinas de células tumorais.^{56,57,58}

7.3. Vacinas de Células Dendríticas

As células dendríticas, descobertas em 1973 por Ralph Steinman, são também utilizadas para estratégias de vacinação antitumorais. Estas células contam com uma elevada capacidade para internalizar antígenos e são as únicas APCs capazes de estimular eficaz e completamente linfócitos T naive. Por estas razões, foram utilizadas para formular vacinas antitumorais, juntamente com adjuvantes, tomando partido da sua capacidade para gerar respostas imunes robustas mediadas por linfócitos T, em particular células T CD8.^{57,59,60,61}

As DCs utilizadas nestas abordagens são obtidas *ex vivo* mediante a exposição a neoantígenos ou pela fusão com células tumorais.^{54,62}

Inicialmente esta estratégia de vacinação, passou por utilizar DCs autólogas, capazes de expressarem moléculas co-estimulatórias e citocinas inflamatórias, fundamentais para a ativação de linfócitos T CD4 e T CD8.^{14,35}

Para além de explorarem a atividade proteica das DCs, estas vacinas são normalmente direcionadas contra vários antígenos, induzindo respostas antitumorais policlonais. Estas características traduziram-se na eficácia clínica e num bom perfil de segurança dando origem, em 2010, à primeira vacina antitumoral aprovada pela FDA, designada de Provenge.^{14,35,57,62}

Apesar do seu sucesso, o desempenho de vacinas baseadas em DCs é em muito influenciado pelo seu grau de diferenciação, pela carga de antígeno, pela via de administração e pelos adjuvantes utilizados. Tal dependência aumenta o grau de complexidade e condiciona o êxito desta estratégia.^{14,60}

7.4. Vacinas Peptídicas

Este tipo de vacinas baseia-se na administração de antígenos tumorais sob a forma de sequências peptídicas ou proteicas.⁵⁴

As formulações de vacinas peptídicas existentes, são na sua maioria direcionadas contra um único antígeno tumoral, podendo também ser direcionadas contra vários antígenos. A utilização de um único epítipo tumoral é, no entanto, benéfica em termos de especificidade e permite eliminar o tumor sem efeitos secundários autoimunes. Embora específicas, estas vacinas conseguem induzir respostas que levam à destruição de células tumorais e à consequente apresentação de detritos celulares a APCs, as quais serão responsáveis por amplificar a gama de epítopos contra a qual os mecanismos antitumorais se dirigem.^{14,22,35}

Apesar da sua forma de atuação, o risco de imunoedição, tolerância, resistência e a recorrência tumoral, exigem a formulação de vacinas direcionadas para vários neoepítopos, tentando sempre preservar uma elevada seletividade.^{14,22,35,63}

A utilização de sequências peptídicas como forma de imunoterapia ativa, é o tipo de vacinação mais frequente em imunoterapia. A sua extensa utilização comparativamente às suas antecessoras, provém da sua facilidade de produção e ao seu bom perfil de segurança. A obtenção de vacinas peptídicas permite de igual forma, um maior controlo sob o processo e a obtenção de uma eficácia superior, comprovada em modelos animais.^{26,27,57}

A composição destas vacinas pode variar, com recurso a sequências de aminoácidos com extensão distinta, modificando as características da vacina. Vacinas com sequências menores, beneficiam de processos de produção relativamente simples e custo-efetivos, porém

a sua dimensão pode limitar o número de antígenos que é capaz de transportar e consequentemente a sua imunogenicidade. Já as vacinas com péptidos longos, fazem uso da sua maior capacidade de transporte para originarem vacinas seguras e mais imunogénicas, com capacidade para ativarem respostas imunitárias mediadas tanto por linfócitos T CD4 como TCD8. No entanto, péptidos de maior dimensão são obtidos com métodos mais onerosos.^{20,57,63}

Apesar do enorme progresso, ainda há muito a explorar para otimizar tanto o tempo de produção, como para melhor compreender e seleccionar a informação e a extensão da sequência peptídica a administrar.^{20,63}

7.5. Vacinas de DNA

O desenvolvimento de vacinas genéticas provém da década de 90, após ter sido demonstrado que a administração de um plasmídeo de DNA codificante, desencadeava a formação de uma resposta imune, específica para o antígeno codificado. Assim, este tipo de vacinação compreende a transfecção de células alvo, utilizando uma sequência de DNA, que ao ser transcrita e traduzida, origina o antígeno ou grupo de antígenos tumorais de interesse. A expressão dos antígenos nas células para as quais a vacina é direcionada, irá promover uma resposta imune.^{63,64}

Vacinas de DNA podem, adicionalmente aos TAAs, ser dirigidas contra TSAs, reduzindo o seu potencial risco autoimune e aumentando a sua capacidade para ligarem a moléculas MHC I e II, induzindo respostas antitumorais mediadas por células T CD8 e T CD4, respetivamente. Em comparação com as abordagens que lhe antecederam, a formulação destas vacinas é processo bastante simples e económico, permitindo gerar vacinas seguras, com efetividade para várias neoplasias e capazes de induzir a formação de memória imunitária de maior duração.^{57,64,65}

Ainda que, as vacinas de DNA revelem claros benefícios, em termos clínicos, o seu desempenho não é o melhor. Tal pode resultar da sua imunogenicidade, por vezes limitada e da manifestação de efeitos adversos graves, ou ainda pela presença dos seus alvos moleculares em tecidos normais.^{57,64,65}

7.6. Vacinas de mRNA

O RNA, como interveniente essencial no processo de síntese proteica, foi descoberto em 1961. Esta foi uma importante conquista para o desenvolvimento de áreas como a genética e a proteómica. Já na década de 90 Wolff *et al.* e Martinon *et al.* passaram a expandir a aplicação

deste conhecimento à criação de um novo conceito de estratégias de vacinação baseadas em mRNA. A prova de conceito deste tipo de estratégia não tardou a surgir, tendo Wolff sido o primeiro a relatar a concepção de proteínas derivadas da expressão do mRNA administrado. Mais tarde, Martinon contribuiu igualmente para os primeiros passos deste novo tipo de vacinas, pela descrição da capacidade do mRNA administrado, induzir uma resposta imune direcionada contra as novas proteínas geradas. Embora os primeiros passos já estivessem dados, foram Martinos e Coonry os cientistas que validaram a aplicabilidade das vacinas de mRNA, utilizando o vírus influenza.^{61,66,67}

O potencial da administração de sequências de ribonucleótidos, para várias situações patológicas, rapidamente foi percebido, denotando não só a sua capacidade para gerar respostas inatas como adaptativas. De forma a potenciar estas vacinas opta-se, em regra geral, por veicular o mRNA para o citoplasma de APCs, das quais se destacam as DCs, como as únicas células capazes de estimular eficazmente linfócitos T naive. Após a entrada para o citoplasma de DCs estas vacinas são traduzidas, e finalmente apresentadas em moléculas MHC na forma de epítomos. Deste modo, induzem a secreção de citocinas por linfócitos Th1 e a estimulação linfócitos T CD4 e T CD8, bem como mecanismos de imunidade humoral.^{38,61,67,68}

Os linfócitos T CD8 são as células citotóxicas por excelência, fulcrais na atividade anti-neoplásica. No entanto, embora tenham uma contribuição espectável menor, os linfócitos T CD4, suportam a atividade de linfócitos T CD8, além de serem capazes de atuar por citotoxicidade e de promoverem a eliminação tumoral, em situações de défice de células T citotóxicas. Ao contrário do que ocorre com linfócitos T CD8, a ausência de T CD4 compromete eficácia da vacina. Assim, a sequência de mRNA administrada deve, idealmente, codificar uma gama de neoepítomos expressos tanto em moléculas MHC I, como MHC II, de forma a ativar linfócitos T CD8 e T CD4, respetivamente. Apesar da dupla ativação, dados clínicos reportam o estímulo preferencial de linfócitos T CD4. Para além da sua função codificante, o mRNA, ao contrário do DNA, ativa também recetores de imunidade inata como TLRs, providenciando uma maior reatividade a estas vacinas.^{20,61,63,67}

A ativação de mecanismos de imunidade inata via TLRs, apesar de aumentar a imunogenicidade das vacinas, pode comprometer a sua eficácia pela dispersão das respostas imunes geradas.⁶⁷

Com o intuito de construir uma vacina de mRNA deve iniciar-se pela seleção do antígeno ou grupo de antígenos contra os quais se pretende induzir uma resposta imunitária, recorrendo para isso a ferramentas de previsão que, com base nas características do neoantígeno, nos permitem antecipar a sua performance *in vivo*. O mRNA administrado é então sintetizado *in vitro*, a partir de uma sequência de DNA que lhe serve de modelo, sendo

constituído por uma região de leitura (ORF), delimitada por regiões não codificantes (UTRs) tanto na extremidade 5' como na 3', um “cap” na região 3' e uma cauda de poli-adeninas (Poly-A) na extremidade 5' (**Figura 3**).^{61,67,69}

A estrutura do mRNA tem, no entanto, um reduzido tempo de semi-vida, após administrado, devido à presença de RNases.⁶⁷



Figura 3 – Esquema da Estrutura do mRNA. Criado com BioRender.²¹ (Adaptado de Sahin, Ugur *et al.*⁷⁰)
Abreviaturas: ORF – região de leitura; UTR – região não codificante.

Vários métodos têm sido estudados com vista a superar tanto o tempo de semi-vida, como a imunogenicidade inata da vacina. A otimização das UTRs escolhidas, pretendendo aumentar a eficácia de tradução e a estabilidade do mRNA em circulação; a variação da extensão da cauda Poli-A e da região “cap” utilizadas, de forma a obter níveis de expressão mais elevados e direcionar o transporte do mRNA, são algumas das estratégias utilizadas. A utilização de ORFs ricas em citosina-guanina permite também exponenciar o processo de síntese proteica.^{26,61,67}

Porém, quando o objetivo é impedir a ativação recetores de imunidade inata, a melhor abordagem passa por utilizar nucleótidos modificados (ex: metilados). A aplicação destes nucleótidos, impede a reatividade contra o vetor (mRNA) aumentando a eficácia antitumoral da vacina.^{27,67,71,72}

A formulação de vacinas de mRNA permitiu superar abordagens anteriores, entre as quais, vacinas peptídicas. Esta estratégia de vacinação denota um perfil de segurança superior, consegue codificar qualquer antigénio tumoral, possibilita a incorporação de vários antigénios numa única sequência e conta com métodos de produção não só mais céleres e económicos, mas também independentes da conformação tridimensional proteica. Estas vacinas de mRNA são aplicáveis à produção em massa, sob boas práticas de produção e são extremamente versáteis, possibilitando com pequenas modificações no método de produção, direcionar as vacinas contra alvos distintos.^{61,67,69}

Comparativamente a plasmídeos, as vacinas de mRNA diferem pela sua expressão transitória, pela ação citoplasmática (e não nuclear), pelo diminuto risco de incorporação no material genético da célula hospedeira, pela maior reprodutibilidade e pelo reduzido risco mutagénico, evidenciando um perfil de segurança superior.^{61,67,71,73}

Apesar dos seus pontos positivos, as suas propriedades eletrostáticas e o seu peso molecular causam alguns constrangimentos à administração sistémica. Todavia, a rápida degradação enzimática e a difícil transfecção *in vivo*, juntamente com o número de administrações, o seu difícil controlo e o risco de toxicidade por sobreexpressão ou atividade contra alvos não pretendidos, constituem possivelmente as maiores limitações desta abordagem.^{61,66,71}

Adaptar sequências de mRNA para utilizar em estratégias de vacinação antitumoral, pode seguir 2 métodos. O primeiro faz uso deste ácido ribonucleico para transfectar DCs *ex vivo*, que serão, de seguida, administradas. Adjuvantes de mRNA podem ser adicionalmente utilizados, sendo capazes de potenciar a ativação das DCs e de interagir com recetores imunitários. Porém, este primeiro método irá originar, em última análise, vacinas de DCs transfectadas com mRNA, as quais não demonstram bons resultados clínicos.^{61,67,68}

Por outro lado, a administração direta do mRNA é a base do segundo método. Este conceito foi validado por Weide *et al.*, confirmando a viabilidade da administração direta de mRNA. Para tal Weide *et al.* fez uso de uma sequência estabilizada com protamina, a qual alcançou respostas imunes específicas e um bom perfil de segurança.^{67,74,75} No entanto, a instabilidade enzimática do mRNA continuou a ser um dos obstáculos a contornar.⁶⁸

7.6.1. Nanopartículas

Idealmente, as vacinas de mRNA devem ser transportadas até ao citoplasma das APCs mais potentes (DCs), onde são expressas.²⁶

De modo a direcionar e melhorar a sua performance *in vivo*, várias técnicas de veiculação têm sido apontadas como estratégias viáveis para vacinas de mRNA. Neste contexto, as nanopartículas são um veículo bastante atrativo. Estas plataformas permitem direcionar o mRNA *in vivo*, mas também conferir-lhe proteção contra a degradação enzimática e processos de clearance.^{71,76,77}

Tendo em conta a gama de nanotransportadores disponíveis, com as mais variadas características, a sua seleção é um passo crucial ao desempenho de vacinas de mRNA. Nos tempos que correm, as nanopartículas lipídicas são o veículo mais utilizado em vacinas de mRNA, as quais serão abordadas nas próximas secções (7.6.2 a 7.6.4).^{71,76,78}

7.6.2. Transporte, Expressão e Apresentação de mRNA *in vivo*

Com o objetivo de transportar, de forma eficiente o mRNA para o seu local de ação, existem várias etapas e processos que devem ser assegurados (**Figura 4**): I) Primeiramente

os nanomateriais escolhidos, devem interagir com o mRNA de modo a originar complexos estáveis; 2) Os complexos formados são então transportados até aos tecidos de interesse; 3) Nesta fase, as células alvo adsorvem as nanopartículas e é formado um endossoma; 4) Já dentro do endossoma, as características dos constituintes da nanopartícula proporcionam a saída do mRNA para o citoplasma; 5) No citosol e junto das estruturas de síntese proteica, o mRNA sofre a etapa final de tradução. Apesar da sua aparente simplicidade, o transporte das sequências de mRNA é bastante desafiante, envolvendo vários fatores de regulação ao longo de cada uma das suas fases.⁷⁷

Após a veiculação e expressão nas células alvo, as proteínas (antígenos) produzidas têm de ser processadas, para que possam ser posteriormente apresentadas sob forma peptídica em complexos com moléculas MHC na superfície celular. A grande maioria das células sintetiza moléculas MHC I, pelo que as moléculas MHC II estão sobretudo restritas a APCs. Estas duas classes do HLA apresentam vias de processamento distintas. Assim, para gerarem respostas mediadas tanto por linfócitos T CD4, como T CD8, os antígenos terão de ser processados por ambas as vias. a) A via de apresentação de antígenos por moléculas MHC I inicia-se com a sua síntese proteica ao nível do citoplasma. De seguida estas novas proteínas são catabolizadas por enzimas no proteossoma, dando origem a péptidos. Com recurso a moléculas de transporte, os péptidos são então deslocados até ao retículo endoplasmático. Neste compartimento e mediante a sua afinidade de ligação, formam complexos estáveis com moléculas MHC I. Por último sofrem, um transporte mediado pelo complexo de Golgi, para a superfície celular, onde são apresentados e reconhecidos por linfócitos T CD8 a fim de desencadarem uma resposta imune. b) De outra forma, o processamento de antígenos passíveis de apresentação em moléculas MHC II, necessita que as novas proteínas formadas sejam, numa primeira fase, secretadas da célula. Após a sua exocitose, estas proteínas deverão retornar à célula numa vesícula endocítica, na qual irão ligar a moléculas MHC II previamente formadas no retículo endoplasmático. Esta interação é favorecida pelo pH ácido da vesícula endocítica. Já formados, os complexos MHC II-epítipo são transportados até à superfície celular onde ativam respostas imunes mediadas por linfócitos T CD4.^{70,79,80}

7.6.3. Nanopartículas Lipídicas

O conceito de Lipossomas, vesículas uni ou multilamelares, constituídas por um núcleo aquoso e uma ou várias bicamadas fosfolipídicas, foi descoberto por Bangham *et al.* no ano de 1965. Desde a sua descoberta, rapidamente passou para a clínica, sendo atualmente um dos nanossistemas mais bem estudado.^{73,76,81}

Os lipossomas são a versão inicial de nanopartículas lipídicas (LNPs), apresentando

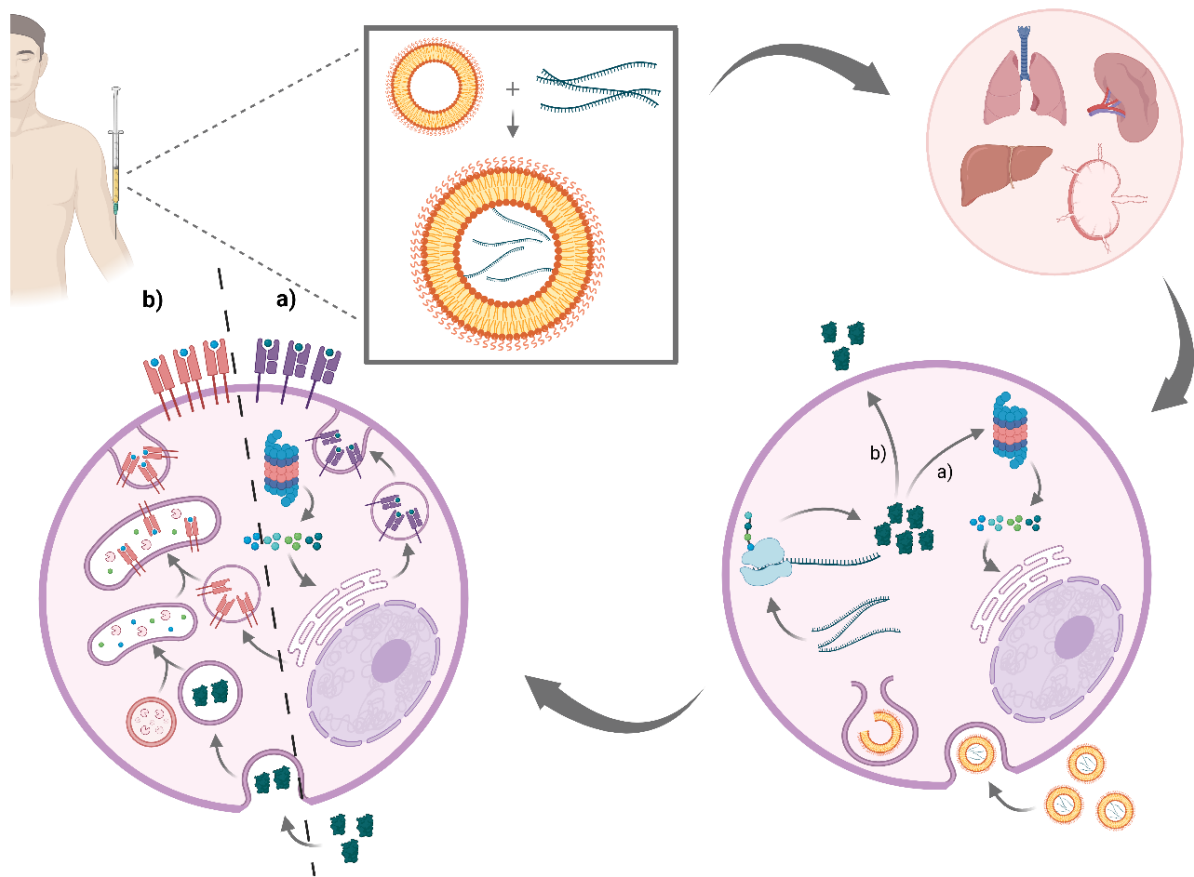


Figura 4 – Transporte de mRNA in vivo. As estratégias de vacinação com mRNA dependem da capacidade de orientação destas plataformas para tecidos estratégicos, onde podem contactar com células dendríticas (DCs) e desencadear uma resposta antitumoral. Porém, após o aporte destes nanossistemas para o citoplasma de DCs é necessário que ocorra a expressão e apresentação de neoepítopos à superfície destas células. A expressão tira partido da maquinaria proteica da célula alvo. Já o processamento das proteínas formadas para que sejam apresentadas a linfócitos T CD4 e TCD8 na superfície da célula pode seguir duas vias distintas: a) a via proteossômica de forma a serem apresentados em moléculas MHC I e b) a via endossomal que permite apresentar epítopos tumorais ligados a moléculas MHC II. Criado com BioRender.²¹ (Adaptado de Sahin, Ugur et al.⁷⁰; Cagigi, Alberto e Loré, Karin⁸²; Ladak, Reese Jalal et al.⁸³).

características versáteis para o transporte de moléculas hidrofílicas (mRNA) ou hidrofóbicas, no núcleo ou entre as cadeias carbonadas da bicamada fosfolipídica. Para além da sua dualidade de transporte, estas estruturas podem variar de composição, podendo ser substituídas por diferentes fosfolípidos, bem como por moléculas como o colesterol, cuja função é estabilizar o lipossoma.^{73,76}

A utilização de lipossomas no transporte diferentes ativos farmacêuticos, toma partido não só da sua função reservatório, controlando a libertação lenta do seu conteúdo, mas também da sua capacidade para direccionar a terapêutica a um tecido alvo. Tais estratégias de veiculação têm igualmente atividade adjuvante, estimulando a libertação de IL-2.⁸⁴

Tendo em conta a celeridade com que esta plataforma passou da teoria à prática clínica, alguns dos fatores que impactam a sua performance são já conhecidos. Desta forma, o seu diâmetro, carga, composição e a organização lamelar são características dos lipossomas a

controlar durante a sua síntese, já que demonstram ter um impacto direto sob a sua estabilidade tanto *in vitro* como *in vivo*.^{73,76}

A maioria dos lípidos utilizados na produção de LNPs é inerte, no entanto, a incorporação de lípidos catiónicos e lípidos peguizados podem ser uma possível limitação para lipossomas, dada a sua pontual citotoxicidade e à capacidade para induzir anticorpos indesejáveis, respetivamente. A limitada seletividade das LNPs não revestidas, o reduzido tempo de semi-vida e a estabilidade, são igualmente fatores condicionantes que podem, no entanto, ser contornados selecionando lipossomas com propriedades adequadas.^{71,73,75}

Como parte de LNPs os lipossomas são suscetíveis de serem funcionalizados. Assim, um dos métodos aplicável para obter lipossomas com as características desejadas, envolve o seu revestimento com ligandos ou polímeros. A incorporação de ligandos à superfície de lipossomas, permite melhorar a sua especificidade, tomando partido da interação ligando-recetor, entre o lipossoma e as células alvo, respetivamente. Neste âmbito, já é conhecida a capacidade de veicular estas vacinas para células do sistema imune. Todavia a maioria das vacinas de mRNA são direcionadas a DCs.^{26,71,73}

A adição de polímeros biocompatíveis de natureza inerte, essencialmente poli(etilenoglicol) (PEG), à superfície destas estruturas proporciona um menor reconhecimento destas nanopartículas por fagócitos. Deste modo, cadeias de PEG permitem superar a rápida eliminação *in vivo* de lipossomas, sendo que o tamanho e a quantidade das cadeias utilizadas regulam o tempo de semi-vida da nanopartícula.⁷³

Considerando a capacidade de transporte das LNPs e o seu sucesso no transporte de ácidos nucleicos, os lipossomas são plataformas atrativas para a produção de vacinas de mRNA seguras e eficazes. No entanto, a fraca difusão do mRNA pelas membranas biológicas, essencialmente devido à sua solubilidade e carácter aniónico, em conjunto com a sua rápida degradação *in vivo*, provocada pelo ataque enzimático, dificultam a sua produção.^{73,78}

De forma a superar estes desafios, as LNPs catiónicas surgem como os transportadores não-virais mais frequentemente utilizados em vacinas de mRNA. A presença de lípidos de carga positiva, proporciona a formação de complexos estáveis com o mRNA, facilitando a sua encapsulação e estabilizando este ácido nucleico. Assim, LNPs com lípidos catiónicos, como lipossomas, permitem encapsular o mRNA no seu interior, protegendo-o do ataque enzimático de RNases *in vivo*.^{54,73}

Após a sua administração por via parenteral, as vacinas de mRNA precisam de ser direcionadas para tecidos específicos, no intuito de desempenharem a sua função. O equilíbrio entre as cargas positivas dos lípidos catiónicos e das cargas negativas do mRNA, desempenha um papel crucial a este nível.^{26,75}

Considerando a sua difícil difusão pelas membranas, os ácidos nucleicos são internalizados para o citoplasma de células alvo pela adsorção da LNP. Esta adsorção é seguida da formação de uma vesícula. A presença de lípidos catiónicos da nanopartícula auxiliam a libertação do mRNA da via endocítica para o citoplasma. Do conjunto de lípidos catiónicos utilizados na formulação de LNPs, favorecem-se os ionizáveis pelo seu melhor perfil de segurança, uma vez que estão na sua forma catiónica em pH ácido (no endossoma), mas permanecem com carga neutra no sangue.^{73,75,76}

A formulação de vacinas de mRNA com nanolipossomas possibilita adicionalmente, uma melhoria no perfil imunogénico destas vacinas.⁸⁵

7.6.4. Ensaio Clínicos

Apesar da recente aposta em vacinas de mRNA, a conceção deste tipo de plataformas data de 1978, com a encapsulação lipossomal do mRNA. Dezassete anos mais tarde, surge a primeira vacina formulada contra antígenos tumorais.^{70,86,87}

Neste momento, com os recentes avanços em terapêuticas génicas, motivados pela necessidade de desenvolver vacinas contra o SARS-CoV2 e a junção de esforços científicos mundiais, permitiu alcançar as primeiras vacinas de mRNA, baseadas em LNPs, aprovadas. A aprovação destas estratégias, desencadeou um aumento exponencial do interesse em vacinas de mRNA.^{73,75,76}

Atualmente são várias as empresas que dedicam os seus esforços à criação de plataformas que possibilitem a eficácia destas vacinas, especialmente em doenças oncológicas. Entre os ensaios clínicos em estado ativo nesta área, segundo o site ClinicalTrials.gov, é possível identificar 4 organizações que tem lugar nas 20 empresas com maior número de patentes: a BioNTech SE, a ModernaTX, a Merck e a Genentech (como membro do grupo Roche).⁸⁸

Aos dias que correm são conhecidos 26 ensaios clínicos em fase ativa, dedicados ao estudo da aplicabilidade, segurança e performance de vacinas de mRNA em doenças oncológicas (**Tabela I**).

Tabela 1 – Ensaios Clínicos com Vacinas de mRNA Antitumorais.

Início	Nome	Ensaio Clínico	Patologia	Alvo Molecular	Veículo	Tipo de Terapêutica	Promotor	Fase	Objetivo	Refs
2014	IVAC_W_breI_u ID / IVAC_M_uID	NCT02316457	Câncer da Mama	shTAAs + NeoAgs	LNPs	Monoterapia	BioNTech SE	I	Segurança, Tolerabilidade, Resposta Imune	89, 90
2015	BTN111	NCT02410733	Melanoma	shTAAs	LNPs	Monoterapia	BioNTech SE	I	Segurança, Tolerabilidade, Taxa de resposta	91, 92
2017	RO7198457	NCT03289962	Melanoma, Câncer do Pulmão, Câncer da Bexiga, Câncer da Mama, Câncer Renal, Câncer da Cabeça e Pescoço, Outros Cânceres Sólidos	NeoAgs	LNPs	Monoterapia Ou Combinada c/ Atezolizumab	Genentech, Inc.	I	Segurança, Tolerabilidade, Resposta Imune, Farmacocinética	93, 94
2017	mRNA-4157	NCT03313778	Tumores Sólidos	NeoAgs	LNPs	Monoterapia Ou Combinada c/ Pembrolizumab	ModernaTX, Inc.	I	Segurança, Tolerabilidade, Imunogenicidade	95, 96, 97, 98
2018	BNT113	NCT03418480	Carcinoma de Células Escamosas, Neoplasia da Cabeça e do Pescoço, Neoplasia Cervical, Neoplasia Peniana Maligna	shTAAs*	LNPs	Monoterapia	BioNTech SE	I/II	Segurança, Tolerabilidade, Dose Recomendada	99, 100, 101, 102
2018	GRT-C901 e GRT-R902	NCT03639714	Câncer do Pulmão, Câncer Colorretal, Adenocarcinoma Gastroesofágico, Carcinoma Urotelial	NeoAgs	Vetores Virais + SAM-LNPs	Combinada c/ Nivolumab e Ipilimumab	Gritstone bio, Inc.	I/II	Segurança, Dose, Imunogenicidade, Avaliação Prévia da Atividade Clínica	103, 104
2019	RO7198457	NCT03815058	Melanoma	NeoAgs	LNPs	Combinada c/ Pembrolizumab	Genentech, Inc.	II	Segurança, Eficácia, Farmacocinética, Resultados	105, 106, 107

2019	mRNA-5671/V941	NCT03948763	Neoplasias, Carcinoma do Pulmão, Neoplasias Pancreáticas, Neoplasias Colorretais	shTAAs	LNPs	Monoterapia Ou Combinada c/ Pembrolizumab	Merck Sharp & Dohme LLC	I	Segurança, Tolerabilidade, Estabelecer uma Dose Recomendada para fase II	108, 109, 110
2019	GRT-C903 e GRT-R904	NCT03953235	Cancro do Pulmão, Cancro Colorretal, Cancro do Pâncreas, Tumores Sólidos, Tumores sólidos com NeoAgs partilhados	shNeoAgs	Vetores Virais + SAM-LNP	Combinada c/ Nivolumab e Ipilimumab	Gritstone bio.Inc.	I/II	Segurança, Dose, Imunogenicidade, Atividade Clínica Preliminar	111, 112, 113, 114
2019	mRNA-4157	NCT03897881	Melanoma	NeoAgs	LNPs	Combinada c/ Pembrolizumab	Moderna TX, Inc.	II	Aumento no Tempo sem Recorrência	115, 116
2019	RO7198457/BTN122	NCT04161755	Cancro do Pâncreas	NeoAgs	LNPs	Combinada c/ Atezolizumab e mFOLFIRINOX	Memorial Sloan Kettering Cancer Center	I	Segurança, Eficácia	106, 117, 118
2019	W_ova1 Vaccine / BTN115	NCT04163094	Cancro do Ovário	shTAAs	LNPs	Combinada c/ Carboplatina, Paclitaxel (e Cirurgia)	University Medical Center Groningen	I	Resposta Imune sistêmica, Resposta Imune intratumoral	119
2020	BNT112	NCT04382898	Cancro da Próstata	shTAAs	LNPs	Monoterapia Ou Combinada c/ Cemiplimab	BioNTech SE	I/II	Segurança, Tolerabilidade, Imunogenicidade, Eficácia Preliminar	100, 120, 121
2020	RO7198457 / BNT122	NCT04486378	Cancro colorretal	NeoAgs	LNPs	Monoterapia	BioNTech SE	II	Eficácia	122, 123, 124
2020	BNT111	NCT04526899	Melanoma	shTAAs	LNPs	Monoterapia Ou Combinada c/ Cemiplimab	BioNTech SE	II	Segurança, Tolerabilidade, Eficácia	92, 100, 125, 126

2020	BNT113	NCT04534205	Cancro da Cabeça e Pescoço	shTAAs*	LNPs	Combinada c/ Pembrolizumab	BioNTech SE	II	Segurança, Tolerabilidade, Eficácia	100, 101, 127
2020	NA	NCT04573140	Glioblastoma	Ags Totais + LAMP-TAAs	LNPs	Monoterapia	Universidade da Flórida	I	Segurança, Viabilidade de Produção, Dose Máxima Tolerada	73, 128, 129, 130
2021	GRT-C901 e GRT-R902	NCT05141721	Neoplasias Colorretais	NeoAgs	Vetores virais + SAM-LNPs	Combinada c/ Atezolizumab, Ipilizumab, Fluoropyrimidin e Bevacizumab	Gritstone bio, Inc.	II/III	Caracterizar a Atividade Clínica como Terapia de Manutenção, Eficácia Clínica	131, 132, 133, 134
2021	BNT116	NCT05142189	Cancro do Pulmão	shTAAs	LNPs	Monoterapia Ou Combinada c/ Cemiplimab ou Docetaxel	BioNTech SE	I	Estabelecer o Perfil de Segurança, Estabelecer uma Dose Segura	135, 136
2022	PGV002 mRNA Vaccine	NCT05192460	Cancro do Estômago, Cancro do Esófago, Cancro do Fígado	NeoAgs	NA	Monoterapia Ou Combinada c/ PD1/L1	jianming xu	NA	Segurança, Tolerabilidade, Eficácia Preliminar	137
2022	SW1115C3	NCT05198752	Tumores Sólidos	NeoAgs	NA	Monoterapia	Stemira Therapeutics	I	Segurança, Tolerabilidade, Imunogenicidade, Eficácia	138, 139
2022	NA	NCT05202561	Tumores Sólidos	NeoAgs	NA	Monoterapia Ou Combinada c/ Navuliumab	First Affiliated Hospital Bengbu Medical College	I	Segurança, Tolerabilidade, Farmacocinética, Eficácia	140
2022	NA	NCT05227378	Cancro Gástrico	NeoAgs	NA	Monoterapia Ou Combinada c/ Navuliumab	Shen Lin	NA	Segurança, Tolerabilidade, Eficácia Preliminar	141

2022	NA	NCT052 64974	Melanoma	Ags Totais	LNPs	Monoterapia	Universidade da Flórida	I	Toxicidade, Viabilidade	¹⁴²
2022	PGY002 mRNA Vaccine	NCT053 59354	Tumores Sólidos	NeoAgs	NA	Monoterapia Ou Combinada c/ PDI	Yuejuan Cheng	NA	Segurança, Tolerabilidade, Eficácia Preliminar	¹⁴³
2022	GRT-C901 e GRT-R902	NCT054 56165	Neoplasias do Cólon, Neoplasias Colorretais	NeoAgs	Vetar viral + SAM-LNPs	Combinada c/ Atezolizumab, Ipilimumab e Quimioterapia	Gritstone bio, Inc.	II	Segurança, Tolerabilidade, Caracterizar a Atividade Antitumoral	¹⁴⁴ , ¹⁴⁵

*Estes shTAAs têm origem viral.

Nota: Esta tabela foi elaborada com base no site ClinicalTrials.gov. Para a sua construção não foram considerados ensaios clínicos com estado “desconhecido”, nem estratégias que utilizam o mRNA como fonte de antígenos para vacinas de DCs produzidas *ex-vivo*.

Abreviaturas: CLDN6 – Proteína Claudina-6; LAMP – Glicoproteína Associada à Membrana do Lisossoma; LNPs – Nanopartículas Lipídicas; mRNA – RNA mensageiro; NeoAgs – Neoantígenos; PDI e PDI/LI – Proteína de Morte Celular Programada I/ Ligando I de Morte Celular Programada; RNA – Ácido Ribonucleico; RNA-LPX – RNA-Lipoplex; SAM-LNPs – LNPs com RNA Autoreplicante; shNeoAgs – Neoantígenos Partilhados; shTAAs – TAAs Partilhados; TAA – Antígenos Associados ao Tumor.

8. Limitações e Desafios Futuros

As doenças oncológicas são a 2ª maior causa de morte a nível mundial, evidenciando a necessidade de novas imunoterapias antitumorais, no entanto várias são as barreiras.⁷⁶

Desde a origem do conceito de imunoterapia que, o maior obstáculo encontrado ao desenvolvimento de novas terapêuticas é a identificação e seleção de alvos moleculares adequados. No entanto, a forte imunossupressão exercida pelo microambiente tumoral e a falta de estratégias de veiculação eficazes, são igualmente identificados como limitações a superar. Por último o processo de imunoedição, escape tumoral e tolerância, juntamente com a heterogeneidade da massa tumoral dificultam também a obtenção de vacinas seguras, versáteis e robustas.^{14,19,27,32,63,64,76}

Com o advento dos novos métodos de sequenciação e ferramentas bioinformáticas, a descoberta e seleção de neoantígenos como alvos moleculares tornou-se possível, marcando uma mudança de paradigma em direção a uma medicina de precisão, com terapêuticas cada vez mais personalizadas. Contudo e embora o sucesso dos últimos anos, há ainda muito para otimizar. A melhoria das tecnologias de predição é um objetivo próximo, para encontrar novos neoantígenos, pretendendo-se para isso, a incorporação de etapas de processamento dos neoantígenos e a ampliação das bases de dados existentes relativamente a epítomos de moléculas MHC II. A aposta em neoepítomos derivados de mutações menos estudadas, como inserções e deleções ou de processos de *splicing* alternativo é igualmente um campo a explorar.^{20,26,63,67,76}

Novos conhecimentos sobre todas as etapas do transporte de mRNA, bem como da sua tradução e da estrutura ribossomal, são também necessários com o objetivo de criar novas e melhoradas estratégias de veiculação baseadas em nanopartículas funcionais. O sinergismo entre diferentes imunoterapias é outro dos temas mais promissores.^{67,71,74,77}

Várias são as oportunidades de melhoria, pelo que a informação dos ensaios clínicos realizados recentemente, será indispensável para avaliar o desempenho das estratégias emergentes e traçar um caminho futuro.⁶⁷

9. Conclusão

As vacinas de mRNA já percorreram um grande percurso desde a sua descoberta. Novos alvos terapêuticos foram incorporados nestas plataformas imunoterapêuticas, permitindo obter melhores perfis imunes e de maior segurança.

A administração destas vacinas com recurso nanotransportadores lipídicos foi igualmente um grande passo para o progresso desta terapêutica. Tais formulações, pretendem convergir no sucesso desta tecnologia, quer pela proteção do mRNA *in vivo*, quer pela sua orientação para tecidos estratégicos e ainda pela ação adjuvante.

Porém as abordagens antitumorais com vacinas de mRNA estão longe de estar otimizadas. A pesquisa de novas fontes de neoantígenos pouco exploradas e a utilização de nanotransportadores formados por constituintes funcionais são alguns dos campos onde é possível inovar. Um conhecimento mais aprofundado sobre o transporte e processamento de vacinas de mRNA *in vivo*, bem como a incorporação dos resultados dos primeiros ensaios clínicos com estas abordagens será também parte essencial ao progresso destas vacinas.

Consideradas como uma das imunoterapias antitumorais do futuro, as vacinas de mRNA ambicionam alterar o paradigma da medicina atual, em direção a terapêuticas cada vez mais personalizadas e que fazem prever uma revolução tanto no tratamento, como na prevenção de tumores.

10. Referências Bibliográficas

1. European Commission - **Glossary: Solid cancer**. [Acedido a 26 de junho de 2022]. Disponível na Internet em: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/security-scanners/en/glossary/pqrs/solid-cancer.htm
2. National Cancer Institute - **NCI Thesaurus**. [Acedido a 26 de junho de 2022]. Disponível na Internet em: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/pages/concept_details.jsf?dictionary=NCI_Thesaurus&version=20.10d&code=C9292&ns=ncit&type=all&key=null&b=1&n=0&vse=null
3. TAN, Shuzhen *et al.* - **Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond**. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 124 (2020), 109821. doi: 10.1016/j.biopha.2020.109821.
4. The Global Cancer Observatory - **The Global Cancer Observatory: Cancer Fact Sheets-All Cancers**. Disponível na Internet em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>
5. GUHA, Prajna *et al.* - **Assessing the Future of Solid Tumor Immunotherapy**. *Biomedicines*. 10:3 (2022), 655. doi: 10.3390/biomedicines10030655.
6. ZHANG, Yuanyuan; ZHANG, Zemin - **The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications**. *Cellular & Molecular Immunology*. 17 (2020), 807–821. doi: 10.1038/s41423-020-0488-6.
7. National Cancer Institute - **Annual Report to the Nation: Rapid decrease in lung cancer and melanoma deaths lead overall continued decline in cancer death rate**. [Acedido a 11 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://www.cancer.gov/news-events/press-releases/2021/annual-report-nation-2021>
8. American Cancer Society - **Cancer Facts & Figures 2019**. Disponível na Internet em: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2019/cancer-facts-and-figures-2019.pdf>
9. WEI, Jiao; HUI, Ai-Min - **The paradigm shift in treatment from Covid-19 to oncology with mRNA vaccines**. *Cancer Treatment Reviews*. 107 (2022), 102405. doi: 10.1016/j.ctrv.2022.102405.
10. National Cancer Institute - **NCI: Can mRNA Vaccines Help Treat Cancer?**. [Acedido a 11 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2022/mrna-vaccines-to-treat-cancer>
11. JAIN, Deepali; HERZOG, Brett H.; MAGGI, Leonard B. - **Genetic Alterations in**

Cancer. In Govindan, Ramaswamy; Devarakonda, Siddhartha. *Cancer Genomics for the Clinician*. New York, NY : Demos Medical, 2019. ISBN 9780826168689, p. 1–13.

12. HERCEG, Zdenko; HAINAUT, Pierre - **Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis.** *Molecular Oncology*. 1:1 (2007), 26–41. doi: 10.1016/j.molonc.2007.01.004.

13. BATTAGLIA, Sebastiano - **Neoantigen prediction from genomic and transcriptomic data.** *Methods in Enzymology*. 635 (2020), 267-281. doi: 10.1016/bs.mie.2019.10.003.

14. KAMRAN, Neha *et al.* - **Recent advances and future of immunotherapy for glioblastoma.** *Expert Opinion on Biological Therapy*. 16:10 (2016), 1245–1264. doi: 10.1080/14712598.2016.1212012.

15. KOSTER, Jan; PLASTERK, Ronald H. A. - **A library of Neo Open Reading Frame peptides (NOPs) as a sustainable resource of common neoantigens in up to 50% of cancer patients.** *Scientific Reports*. 9 (2019), 6577. doi: 10.1038/s41598-019-42729-2.

16. SHEN, Luhui *et al.* - **RNA Transcription and Splicing Errors as a Source of Cancer Frameshift Neoantigens for Vaccines.** *Scientific Reports*. 9 (2019), 17815. doi: 10.1038/s41598-019-50738-4.

17. LANG, Franziska *et al.* - **Identification of neoantigens for individualized therapeutic cancer vaccines.** *Nature Reviews Drug Discovery*. 21:4 (2022), 261–282. doi: 10.1038/s41573-021-00387-y.

18. WANG, Yue *et al.* - **Gene fusion neoantigens: Emerging targets for cancer immunotherapy.** *Cancer Letters*. 506 (2021), 45–54. doi: 10.1016/j.canlet.2021.02.023.

19. KALOS, Michael - **Tumor antigen-specific T cells and cancer immunotherapy: current issues and future prospects.** *Vaccine*. 21:7–8 (2003), 781–786. doi: 10.1016/S0264-410X(02)00598-4.

20. SHETTY, Keerthi; OTT, Patrick A. - **Personal Neoantigen Vaccines for the Treatment of Cancer.** *Annual Review of Cancer Biology*. 5:1 (2021), 259–276. doi: 10.1146/annurev-cancerbio-060820-111701.

21. BIORENDER - BioRender [Acedido a 18 agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://biorender.com/>

22. HERLYN, Dorothee; BIREBENT, Brigitte - **Special Section:Future Trends in Vaccination: Advances in cancer vaccine development.** *Annals of Medicine*. 31:1

(1999), 66–78. doi: 10.3109/07853899909019264.

23. SCHUMACHER, Ton N. *et al.* - **Cancer Neoantigens**. *Annual Review of Immunology*. 37:1 (2019), 173–200. doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053402.

24. EFREMOVA, Mirjana *et al.* - **Neoantigens Generated by Individual Mutations and Their Role in Cancer Immunity and Immunotherapy**. *Frontiers in Immunology*. 8 (2017), 1679. doi: 10.3389/fimmu.2017.01679.

25. ZHANG, Zheyang *et al.* - **Neoantigen: A New Breakthrough in Tumor Immunotherapy**. *Frontiers in Immunology*. 12 (2021), 672356. doi: 10.3389/fimmu.2021.672356.

26. GRABBE, Stephan *et al.* - **Translating nanoparticulate-personalized cancer vaccines into clinical applications: case study with RNA-lipoplexes for the treatment of melanoma**. *Nanomedicine*. 11:20 (2016), 2723–2734. doi: 10.2217/nnm-2016-0275.

27. HACOHEN, Nir *et al.* - **Getting Personal with Neoantigen-Based Therapeutic Cancer Vaccines**. *Cancer Immunology Research*. 1:1 (2013), 11–15. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0022.

28. JIANG, Tao *et al.* - **Tumor neoantigens: from basic research to clinical applications**. *Journal of Hematology & Oncology*. 12:1 (2019), 93. doi: 10.1186/s13045-019-0787-5.

29. CAPIETTO, Aude-Hélène *et al.* - **Cancer neoantigens and immunogenicity: mutation position matters**. *Molecular & Cellular Oncology*. 7:3 (2020), 1740071. doi: 10.1080/23723556.2020.1740071.

30. MAROFI, Farogh *et al.* - **CAR T cells in solid tumors: challenges and opportunities**. *Stem Cell Research & Therapy*. 12:1 (2021), 81. doi: 10.1186/s13287-020-02128-1.

31. TAHMASEBI, Safa *et al.* - **Solid Tumors Challenges and New Insights of CAR T Cell Engineering**. *Stem Cell Reviews and Reports*. 15:5 (2019), 619–636. doi: 10.1007/s12015-019-09901-7.

32. WU, Annie A. *et al.* - **Reprogramming the tumor microenvironment: tumor-induced immunosuppressive factors paralyze T cells**. *Oncolmmunology*. 4:7 (2015), e1016700. doi: 10.1080/2162402X.2015.1016700.

33. MURRAY, J. C.; CARMICHAEL, J. - **Targeting solid tumours: challenges,**

- disappointments, and opportunities.** *Advanced Drug Delivery Reviews*. 17:1 (1995), 117–127. doi: 10.1016/0169-409X(95)00044-8.
34. LODE, Holger N. - **Approaches to Passive and Active Vaccination against Neuroblastoma.** *Pediatric and Adolescent Medicine*. 20 (2015), 150–162. doi: 10.1159/000382100.
35. KATZ, Tamar *et al.* - **Dendritic Cell Cancer Vaccines: From the Bench to the Bedside.** *Rambam Maimonides Medical Journal*. 5:4 (2014), e0024. doi: 10.5041/RMMJ.10158.
36. SALEH, Reem; ELKORD, Eyad - **Acquired resistance to cancer immunotherapy: Role of tumor-mediated immunosuppression.** *Seminars in Cancer Biology*. 65 (2020), 13–27. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.07.017.
37. OHTA, Akio; SITKOVSKY, Michail - **Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells.** *Frontiers in Immunology*. 5 (2014), 304. doi: 10.3389/fimmu.2014.00304.
38. RÜTTINGER, Dominik *et al.* - **Immunotherapy of Cancer: Key Findings and Commentary on the Third Tegernsee Conference.** *The Oncologist*. 15:1 (2010), 112–118. doi: 10.1634/theoncologist.2009-0213.
39. CHINEN, Takatoshi *et al.* - **An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function.** *Nature Immunology*. 17:11 (2016), 1322–1333. doi: 10.1038/ni.3540.
40. CHENG, Michael L.; FONG, Lawrence - **Effects of RANKL-Targeted Therapy in Immunity and Cancer.** *Frontiers in Oncology*. 3 (2014), 329. doi: 10.3389/fonc.2013.00329.
41. OLDFORD, Sharon A.; MARSHALL, Jean S. - **Mast cells as targets for immunotherapy of solid tumors.** *Molecular Immunology*. 63:1 (2015), 113–124. doi: 10.1016/j.molimm.2014.02.020.
42. VONDERHEIDE, Robert H.; JUNE, Carl H. - **A Translational Bridge to Cancer Immunotherapy: Exploiting Costimulation and Target Antigens for Active and Passive T Cell Immunotherapy.** *Immunologic Research*. 27:2–3 (2003), 341–356. doi: 10.1385/IR:27:2-3:341.
43. PIÑEIRO FERNÁNDEZ, Julián *et al.* - **Hepatic Tumor Microenvironments and Effects on NK Cell Phenotype and Function.** *International Journal of Molecular Sciences*. 20:17 (2019), 4131. doi: 10.3390/ijms20174131.
44. ZHANG, Jun; VEERAMACHANENI, Nirmal - **Targeting interleukin-1 β and inflammation in lung cancer.** *Biomarker Research*. 10:1 (2022), 5. doi: 10.1186/s40364-

021-00341-5.

45. COLEY, WILLIAM B. - **THE TREATMENT OF INOPERABLE SARCOMA WITH THE 'MIXED TOXINS OF ERYSIPELAS AND BACILLUS PRODIGIOSUS**. *Journal of the American Medical Association*. XXXI:9 (1898), 456-465. doi: 10.1001/jama.1898.92450090022001g.
46. COLEY, W. B. - **THE TREATMENT OF MALIGNANT TUMORS BY REPEATED INOCULATIONS OF ERYSIPELAS**. *Clinical orthopaedics and related research*. XX:22 (1893), 615-616. doi: 10.1001/jama.1893.02420490019007.
47. HOOVER, Herbert C. *et al.* - **Prospectively randomized trial of adjuvant active-specific immunotherapy for human colorectal cancer**. *Cancer*. 55:6 (1985), 1236–1243. doi: 10.1002/1097-0142(19850315)55:6<1236::aid-cncr2820550616>3.0.co;2-%23.
48. KANTOFF, Philip W. *et al.* - **Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer**. *New England Journal of Medicine*. 363:5 (2010), 411–422. doi: 10.1056/NEJMoa1001294.
49. U.S. Food and Drug Administration (FDA) - **PROVENGE (sipuleucel-T)**. [Acedido a 2 de julho de 2022]. Disponível na Internet em: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/provenge-sipuleucel-t>
50. LIU, Jian *et al.* - **Cancer vaccines as promising immuno-therapeutics: platforms and current progress**. *Journal of Hematology & Oncology*. 15:1 (2022), 28. doi: 10.1186/s13045-022-01247-x.
51. IIZUMI, Susumu *et al.* - **Identification of Novel HLA Class II-Restricted Neoantigens Derived from Driver Mutations**. *Cancers*. 11:2 (2019), 266. doi: 10.3390/cancers11020266.
52. REDDY, Bobby Y. *et al.* - **Somatic driver mutations in melanoma**. *Cancer*. 123:S11 (2017), 2104–2117. doi: 10.1002/cncr.30593.
53. REPÁRAZ, David *et al.* - **Neoantigens as potential vaccines in hepatocellular carcinoma**. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 10:2 (2022), e003978. doi: 10.1136/jitc-2021-003978.
54. REYNOLDS, Carson R. *et al.* - **Neoantigen Cancer Vaccines: Generation, Optimization, and Therapeutic Targeting Strategies**. *Vaccines*. 10:2 (2022), 196. doi: 10.3390/vaccines10020196.
55. HANNA, M. G.; PETERS, L. C. - **Specific immunotherapy of established visceral**

micrometastases by BCG-tumor cell vaccine alone or as an adjunct to surgery. *Cancer*. 42:6 (1978), 2613–2625. doi: 10.1002/1097-0142(197812)42:6<2613::AID-CNCR 2820420617>3.0.CO;2-K.

56. GRUIJL, Tanja D. DE *et al.* - **Whole-cell cancer vaccination: from autologous to allogeneic tumor- and dendritic cell-based vaccines.** *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 57:10 (2008), 1569–1577. doi: 10.1007/s00262-008-0536-z.

57. DEMARIA, Peter J.; BILUSIC, Marijo - **Cancer Vaccines.** *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 33:2 (2019), 199–214. doi: 10.1016/j.hoc.2018.12.001.

58. DILLMAN, R. O. *et al.* - **Short-term tumor cell lines from breast cancer for use as autologous tumor cell vaccines in the treatment of breast cancer.** *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 16:3 (2001), 205–211. doi: 10.1089/10849780152389393.

59. STEINMAN, Ralph M.; COHN, Zanvil A. - **Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution.** *Journal of Experimental Medicine*. 137:5 (1973), 1142–1162. doi: 10.1084/jem.137.5.1142.

60. FRANKENBERGER, Bernhard; SCHENDEL, Dolores J. - **Third generation dendritic cell vaccines for tumor immunotherapy.** *European Journal of Cell Biology*. 91:1 (2012) 53–58. doi: 10.1016/j.ejcb.2011.01.012.

61. FIEDLER, Katja *et al.* - mRNA Cancer Vaccines. Ed: Walther, Wolfgang. *Recent Results in Cancer Research*. Berlin Germany: Springer International Publishing, (2016). ISBN 9783319429342v. 209, p. 61–85.

62. SURMONT, Veerle F. *et al.* - **Investigational approaches for mesothelioma.** *Frontiers in Oncology*. 1 (2011), 22. doi: 10.3389/fonc.2011.00022.

63. ALCAZER, Vincent *et al.* - **Neopeptides-based vaccines: challenges and perspectives.** *European Journal of Cancer*. 108 (2019), 55–60. doi: 10.1016/j.ejca.2018.12.011.

64. LEITNER, Wolfgang W. *et al.* - **DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects.** *Vaccine*. 18:9–10 (1999), 765–777. doi: 10.1016/S0264-410X(99)00271-6.

65. QIAN, Ben Jiang *et al.* - **MTDH/AEG-I-based DNA vaccine suppresses lung metastasis and enhances chemosensitivity to doxorubicin in breast cancer.** *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 60:6 (2011), 883–893. doi: 10.1007/s00262-011-0997-3.

66. BRENNER, S. *et al.* - **An Unstable Intermediate Carrying Information from Genes to Ribosomes for Protein Synthesis.** *Nature.* 190:4776 (1961), 576–581. doi: 10.1038/190576a0.
67. ESPRIT, Arthur *et al.* - **Neo-Antigen mRNA Vaccines.** *Vaccines.* 8:4 (2020), 776. doi: 10.3390/vaccines8040776.
68. LI, Jinming *et al.* - **Messenger RNA vaccine based on recombinant MS2 virus-like particles against prostate cancer.** *International Journal of Cancer.* 134:7 (2014), 1683–1694. doi: 10.1002/ijc.28482.
69. HOLTKAMP, Silke *et al.* - **Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells.** *Blood.* 108:13 (2006), 4009–4017. doi: 10.1182/blood-2006-04-015024.
70. SAHIN, Ugur *et al.* - **mRNA-based therapeutics — developing a new class of drugs.** *Nature Reviews Drug Discovery.* 13:10 (2014), 759–780. doi: 10.1038/nrd4278.
71. TARAB-RAVSKI, Dana *et al.* - **Delivery strategies of RNA therapeutics to leukocytes.** *Journal of Controlled Release.* 342 (2022), 362–371. doi: 10.1016/j.jconrel.2022.01.016.
72. ANDERSON, Bart R. *et al.* - **Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation.** *Nucleic Acids Research.* 38:17 (2010), 5884–5892. doi: 10.1093/nar/gkq347.
73. TENCHOV, Rumiana *et al.* - **Lipid Nanoparticles—From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement.** *ACS Nano.* 15:11 (2021), 16982–17015. doi: 10.1021/acsnano.1c04996.
74. WEIDE, Benjamin *et al.* - **Direct Injection of Protamine-protected mRNA: Results of a Phase I/2 Vaccination Trial in Metastatic Melanoma Patients.** *Journal of Immunotherapy.* 32:5 (2009), 498–507. doi: 10.1097/CJI.0b013e3181a00068.
75. ŽAK, Magdalena M.; ZANGI, Lior - **Lipid Nanoparticles for Organ-Specific mRNA Therapeutic Delivery.** *Pharmaceutics.* 13:10 (2021), 1675. doi: 10.3390/pharmaceutics13101675.
76. MITCHELL, Michael J. *et al.* - **Engineering precision nanoparticles for drug delivery.** *Nature Reviews Drug Discovery.* 20:2 (2021), 101–124. doi: 10.1038/s41573-020-0090-8.

77. WANG, Yue; YU, Chengzhong - **Emerging Concepts of Nanobiotechnology in mRNA Delivery**. *Angewandte Chemie International Edition*. 59:52 (2020), 23374–23385. doi: 10.1002/anie.202003545.
78. MEYER, Randall A. *et al.* - **A scalable and robust cationic lipid/polymer hybrid nanoparticle platform for mRNA delivery**. *International Journal of Pharmaceutics*. 611 (2022), 121314. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.121314.
79. DÖRFEL, Daniela *et al.* - **Processing and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with in vitro–transcribed MUC1 RNA**. *Blood*. 105:8 (2005), 3199–3205. doi: 10.1182/blood-2004-09-3556.
80. ROCHA, Nuno; NEEFJES, Jacques - **MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation**. *The EMBO Journal*. 27:1 (2008), 1–5. doi: 10.1038/sj.emboj.7601945.
81. BANGHAM, A. D. - **Membrane models with phospholipids**. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 18 (1968), 29–95. doi: 10.1016/0079-6107(68)90019-9.
82. CAGIGI, Alberto; LORÉ, Karin - **Immune Responses Induced by mRNA Vaccination in Mice, Monkeys and Humans**. *Vaccines*. 9:1 (2021), 61. doi: 10.3390/vaccines9010061.
83. LADAK, Reese Jalal *et al.* - **The Current Landscape of mRNA Vaccines Against Viruses and Cancer—A Mini Review**. *Frontiers in Immunology*. 13 (2022), 885371. doi: 10.3389/fimmu.2022.885371.
84. Philippot, J.R., & Schuber, F. - **Liposomes as Tools in Basic Research and Industry**. 1^a Ed. Boca Raton: CRC Press, 2019. ISBN 9780203713259.
85. SAYOUR, Elias J. *et al.* - **Systemic activation of antigen-presenting cells via RNA-loaded nanoparticles**. *Oncolmmunology*. 6:1 (2017), e1256527. doi: 10.1080/2162402X.2016.1256527.
86. DIMITRIADIS, GIORGOS J. - **Translation of rabbit globin mRNA introduced by liposomes into mouse lymphocytes**. *Nature*. 274:5674 (1978), 923–924. doi: 10.1038/274923a0.
87. CONRY, Robert M. *et al.* - **Characterization of a Messenger RNA Polynucleotide Vaccine Vector I**. *Cancer Research*. 55:7 (1995), 1397–1400. Disponível na Internet em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/55/7/1397/502087/Characterization-of-a-Messenger-RNA-Polynucleotide>

88. LI, Mengyao *et al.* - **The global mRNA vaccine patent landscape.** Human Vaccines & Immunotherapeutics. (2022), 2095837. doi: 10.1080/21645515.2022.2095837.
89. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **RNA-Immunotherapy of IVAC_W_breI_uID and IVAC_M_uID (TNBC-MERIT).** [Acedido a 2 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02316457?term=mRNA+vaccine&draw=19&rank=180>
90. SCHMIDT, M. *et al.* - **88MO T-cell responses induced by an individualized neoantigen specific immune therapy in post (neo)adjuvant patients with triple negative breast cancer.** Annals of Oncology. 31:S4 (2020), S276. doi: 10.1016/j.annonc.2020.08.209.
91. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **Evaluation of the Safety and Tolerability of i.v. Administration of a Cancer Vaccine in Patients With Advanced Melanoma.** [Acedido a 4 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02410733?term=NCT02410733&draw=2&rank=1>
92. SAHIN, Ugur *et al.* - **An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma.** Nature. 585:7823 (2020), 107–112. doi: 10.1038/s41586-020-2537-9.
93. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **A Study of Autogene Cevumeran (RO7198457) as a Single Agent and in Combination With Atezolizumab in Participants With Locally Advanced or Metastatic Tumors.** [Acedido a 4 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03289962?term=NCT03289962&draw=2&rank=1>
94. American Association for Cancer Research - **AACR: Personalized Cancer Vaccine Plus Atezolizumab Shows Clinical Activity in Patients With Advanced Solid Tumors.** [Acedido 4 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://www.aacr.org/about-the-aacr/newsroom/news-releases/personalized-cancer-vaccine-plus-atezolizumab-shows-clinical-activity-in-patients-with-advanced-solid-tumors/>
95. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **Safety, Tolerability, and Immunogenicity of mRNA-4157 Alone in Participants With Resected Solid Tumors and in Combination With Pembrolizumab in Participants With Unresectable Solid Tumors (KEYNOTE-603).** [Acedido a 2 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03313778?term=NCT03313778&draw=2&rank=1>

96. BAUMAN, Julie *et al.* - **798 Safety, tolerability, and immunogenicity of mRNA-4157 in combination with pembrolizumab in subjects with unresectable solid tumors (KEYNOTE-603): an update.** *Journal for ImmunoTherapy of Cancer.* 8:3 (2020). doi: 10.1136/jitc-2020-SITC2020.0798
97. MODERNA, Inc - **Moderna Announces First-in-Human Dosing for Phase I Study (KEYNOTE-603) of mRNA-4157, a Personalized Cancer Vaccine, for the Treatment of Solid Tumors.** [Acedido a 2 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://investors.modernatx.com/news/news-details/2017/Moderna-Announces-First-in-Human-Dosing-for-Phase-I-Study-KEYNOTE-603-of-mRNA-4157-a-Personalized-Cancer-Vaccine-for-the-Treatment-of-Solid-Tumors/default.aspx>
98. BURRIS, Howard A. *et al.* - **A phase I multicenter study to assess the safety, tolerability, and immunogenicity of mRNA-4157 alone in patients with resected solid tumors and in combination with pembrolizumab in patients with unresectable solid tumors.** *Journal of Clinical Oncology.* 37:15 (2019), 2523. doi: 10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.2523.
99. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **HPV Anti-CD40 RNA Vaccine (HARE-40).** [Acedido a 2 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03418480?term=mRNA+vaccine&draw=12&rank=102>
100. BIONTECH SE - **BioNTech Pipeline: Breakthrough technologies across four different drug classes to revolutionize medicine.** [Acedido a 2 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://www.biontech.com/int/en/home/pipeline-and-products/pipeline.html>
101. National Cancer Institute - **NCI Drug Dictionary: HPV16 E6/7 mRNA vaccine BNT113.** [Acedido a 2 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/hpv16-e6-7-mrna-vaccine-bnt113>
102. WANG, Chuan *et al.* - **Targeting Head and Neck Cancer by Vaccination.** *Frontiers in Immunology.* 9 (2018), 830. doi: 10.3389/fimmu.2018.00830.
103. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **A Study of a Personalized Neoantigen Cancer Vaccine.** [Acedido a 2 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03639714?term=neoantigens+vaccines&draw=8>
104. JOHNSON, M. L. *et al.* - **First Results of Phase I/II Studies Evaluating Viral**

Vector-Based Heterologous Prime/Boost Immunotherapy Against Predicted HLA Class I Neoantigens Demonstrate CD8 T Cell Responses In Patients with Advanced Cancers. *Annals of Oncology*. 30:11 (2019), X134. doi: 10.1093/annonc/mdz451.002.

105. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **A Study to Evaluate The Efficacy And Safety Of RO7198457 In Combination With Pembrolizumab Versus Pembrolizumab Alone In Participants With Previously Untreated Advanced Melanoma.** [Acedido a 4 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03815058?term=NCT03815058&draw=2&rank=1>

106. BRAITEH, Fadi *et al.* - **Abstract CT169: A phase Ia study to evaluate RO7198457, an individualized Neoantigen Specific immunoTherapy (iNeST), in patients with locally advanced or metastatic solid tumors.** *Cancer Research*. 80:16 (2020), CT169. doi: 10.1158/1538-7445.AM2020-CT169.

107. GENENTECH, Inc. - **Genentech Pipeline: Autogene cevumeran.** [Acedido a 4 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://www.gene.com/medical-professionals/pipeline>

108. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **A Study of mRNA-5671/V941 as Monotherapy and in Combination With Pembrolizumab (V941-001).** [Acedido a 4 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03948763?term=NCT03948763&draw=2&rank=1>

109. MERCK & CO., Inc. - **MERK News release: Moderna and Merck Expand mRNA Cancer Vaccines Collaboration.** [Acedido a 4 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://www.merck.com/news/moderna-and-merck-expand-mrna-cancer-vaccines-collaboration/>

110. National Cancer Institute - **NCI Dictionary: mRNA-derived KRAS-targeted vaccine V941.** [Acedido a 4 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/mrna-derived-kras-targeted-vaccine-v941>

111. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **A Study of a Personalized Cancer Vaccine Targeting Shared Neoantigens.** [Acedido a 2 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03953235?term=neoantigens+vaccines&draw=7>

112. GRITSTONE BIO, Inc. - **Press Release Details: Gritstone Presentations at AACR Further Support Expertise in Neoantigen Vaccine Design and Delivery.** [Acedido a 2 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://ir.gritstonebio.com/news-releases/news-release-details/gritstone-presentations-aacr-further-support-expertise>
113. DRAKE, Charles G. *et al.* - **Personalized viral-based prime/boost immunotherapy targeting patient-specific or shared neoantigens: Immunogenicity, safety, and efficacy results from two ongoing phase I studies.** *Journal of Clinical Oncology*. 38:15 (2020), 3137. doi: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.3137.
114. RAPPAPORT, Amy R. *et al.* - **Abstract 3578: Optimization of shared neoantigen vaccine design to increase vaccine potency: From bench to bedside and back.** *Cancer Research*. 82:12 (2022), 3578. doi: 10.1158/1538-7445.AM2022-3578.
115. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **An Efficacy Study of Adjuvant Treatment With the Personalized Cancer Vaccine mRNA-4157 and Pembrolizumab in Participants With High-Risk Melanoma (KEYNOTE-942).** [Acedido a 2 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03897881?term=mRNA+vaccine&draw=28&rank=267>
116. MODERNATX, Inc. - **Research - Product pipeline - Clinical trials.** [Acedido a 2 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://www.modernatx.com/research/product-pipeline>.
117. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **Study of Personalized Tumor Vaccines (PCVs) and a PD-L1 Blocker in Patients With Pancreatic Cancer That Can be Treated With Surgery.** [Acedido a 4 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04161755?term=NCT04161755&draw=2&rank=1>
118. BIONTECH SE - **BioNTech Pipeline Platforms: The conception of our mRNA platforms – revolutionizing vaccine technology.** [Acedido a 4 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://www.biontech.com/int/en/home/pipeline-and-products/platforms/our-mrna-platforms.html>
119. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **Ovarian Cancer Treatment With a Liposome Formulated mRNA Vaccine in Combination With (Neo-)Adjuvant Chemotherapy (OLIVIA).** [Acedido a 4 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04163094?term=NCT04163094&draw=2&rank=1>

120. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **PRO-MERIT (Prostate Cancer Messenger RNA Immunotherapy) (PRO-MERIT)**. [Acedido a 4 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04382898?term=NCT04382898&draw=2&rank=1>
121. LINCH, Mark *et al.* - **421 A first-in-human (FIH) phase I/IIa clinical trial assessing a ribonucleic acid lipoplex (RNA-LPX) encoding shared tumor antigens for immunotherapy of prostate cancer; preliminary analysis of PRO-MERIT**. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 9:2 (2021), 421. doi: 10.1136/jitc-2021-SITC2021.421.
122. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **A Phase II Clinical Trial Comparing the Efficacy of RO7198457 Versus Watchful Waiting in Patients With ctDNA-positive, Resected Stage II (High Risk) and Stage III Colorectal Cancer**. [Acedido a 4 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04486378?term=NCT04486378&draw=2&rank=1>
123. BIONTECH SE - **BioNTech Press Release: BioNTech Expands Clinical Oncology Portfolio with First Patient Dosed in Phase 2 Trial of mRNA-based Individualized Immunotherapy BNT122 in Colorectal Cancer Patients**. [Acedido a 4 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://investors.biontech.de/news-releases/news-release-details/biontech-expands-clinical-oncology-portfolio-first-patient-dosed>
124. PAO, Shih-Cheng *et al.* - **Therapeutic Vaccines Targeting Neoantigens to Induce T-Cell Immunity against Cancers**. *Pharmaceutics*. 14:4 (2022), 867. doi: 10.3390/pharmaceutics14040867.
125. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **Trial With BNT111 and Cemiplimab in Combination or as Single Agents in Patients With Anti-PD-1-refractory/Relapsed, Unresectable Stage III or IV Melanoma**. [Acedido a 2 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04526899?term=mRNA+vaccine&draw=28>
126. BIONTECH SE - **BioNTech Receives FDA Fast Track Designation for its FixVac Candidate BNT111 in Advanced Melanoma**. [Acedido a 2 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://investors.biontech.de/news-releases/news-release-details/biontech-receives-fda-fast-track-designation-its-fixvac>
127. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **A Clinical Trial Investigating the Safety, Tolerability, and Therapeutic Effects of BNT113 in Combination With Pembrolizumab Versus Pembrolizumab Alone for Patients**

With a Form of Head and Neck Cancer Positive for Human Papilloma Virus 16 and Expressing the Protein PD-L1 (AHEAD-MERIT). [Acedido a 3 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04534205?term=mRNA+vaccine&draw=26>

128. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **A Study of RNA-lipid Particle (RNA-LP) Vaccines for Newly Diagnosed Pediatric High-Grade Gliomas (pHGG) and Adult Glioblastoma (GBM) (PNOC020).** [Acedido a 3 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04573140?term=mRNA+vaccine&draw=32>

129. BECK, Jan D. *et al.* - **mRNA therapeutics in cancer immunotherapy.** *Molecular Cancer.* 20:1 (2021), 69. doi: 10.1186/s12943-021-01348-0.

130. CUI, Jiwei *et al.* - **Gather wisdom to overcome barriers: Well-designed nano-drug delivery systems for treating gliomas.** *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 12:3 (2022), 1100–1125. doi: 10.1016/j.apsb.2021.08.013.

131. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **A Study of a Personalized Neoantigen Vaccine in Combination With Immune Checkpoint Blockade for Patients With Metastatic Colorectal Cancer.** [Acedido a 3 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05141721?term=neoantigens+vaccines&draw=3&rank=16>

132. GRITSTONE BIO, Inc. - **Gritstone Pipeline: Building a Pipeline of Immunotherapies.** [Acedido a 3 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://gritstonebio.com/our-pipeline/#granite>

133. GRITSTONE BIO, Inc. - **Gritstone Press Releases: Gritstone Announces Updated Overall Survival Results in Advanced Colorectal Cancer Patients from Phase I/2 Study of GRANITE and Trial in Progress Poster at ASCO.** [Acedido a 3 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://ir.gritstonebio.com/news-releases/news-release-details/gritstone-announces-updated-overall-survival-results-advanced>

134. HECHT, J. Randolph *et al.* - **Phase 2/3, randomized, open-label study of an individualized neoantigen vaccine (self-amplifying mRNA and adenoviral vectors) plus immune checkpoint blockade as maintenance for patients with newly diagnosed metastatic colorectal cancer (GRANITE).** *Journal of Clinical Oncology.* 40:16 (2022), TPS3635. doi: 10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.TPS3635.

135. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **Clinical Trial Evaluating the Safety, Tolerability and Preliminary Efficacy of BNT116 Alone and in Combinations in Patients With Advanced Non-small Cell Lung Cancer (LuCaMERIT-1)**. [Acedido a 4 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05142189?term=NCT05142189&draw=2&rank=1>
136. BIONTECH SE - **BioNTech Press Release: BioNTech and Regeneron Expand Strategic Collaboration to Advance Clinical Development of FixVac and Libtayo® (cemiplimab) Combination in NSCLC**. [Acedido a 4 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://investors.biontech.de/news-releases/news-release-details/biontech-and-regeneron-expand-strategic-collaboration-advance/>
137. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **Safety and Efficacy of Personalized Neoantigen Vaccine in Advanced Gastric Cancer, Esophageal Cancer and Liver Cancer**. [Acedido a 3 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05192460?term=neoantigens+RNA+vaccines&draw=2&rank=2>
138. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **A Study of Neoantigen mRNA Personalised Cancer in Patients With Advanced Solid Tumors**. [Acedido a 3 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05198752?term=mRNA+vaccine&draw=32&rank=301>
139. National Cancer Institute - **NCI Thesaurus: Neoantigen mRNA Personalized Cancer Vaccine SW115C3**. [Acedido a 3 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&version=22.04d&code=C186672&ns=ncit
140. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **A Study of RNA Tumor Vaccine in Patients With Advanced Solid Tumors**. [Acedido a 3 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05202561?term=mRNA+vaccine&draw=21&rank=196>
141. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **Safety and Efficacy of Personalized Neoantigen Vaccine in Advanced Gastric Cancer**. [Acedido a 3 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05227378?term=mRNA+vaccine&draw=35>
142. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **Novel RNA-nanoparticle Vaccine for the Treatment of Early Melanoma Recurrence Following**

Adjuvant Anti-PD-I Antibody Therapy. [Acedido a 3 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05264974?term=mRNA+vaccine&draw=23>

143. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **Safety and Efficacy of Personalized Neoantigen Vaccine in Advanced Solid Tumors.** [Acedido a 3 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05359354?term=neoantigens+RNA+vaccines&draw=2&rank=3>

144. National Institutes Of Health; National Library Of Medicine - **Study of an Individualized Vaccine Targeting Neoantigens in Combination With Immune Checkpoint Blockade for Patients With Colon Cancer.** [Acedido a 3 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05456165?term=mRNA+vaccine&draw=37&rank=355>

145. National Cancer Institute - **NCI: mRNA-based tumor-specific neoantigen boosting vaccine GRT-R902.** [Acedido a 3 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/mrna-based-tumor-specific-neoantigen-boosting-vaccine-grt-r902>