



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Sofia Mourão Santos

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Viroterapia Oncolítica no Cancro da Mama: Quão longe da realidade?” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Paula Soares, do Dr. Rafael Pereira e da Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Sofia Mourão Santos

Relatório de Estágio e Monografia intitulada "Viroterapia Oncolítica no Cancro da Mama: Quão longe da realidade?" referentes à Unidade Curricular "Estágio", sob a orientação da Dra. Paula Soares, do Dr. Rafael Pereira e da Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2020

Eu, Sofia Mourão Santos, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2015245256, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Viroterapia Oncolítica no Cancro da Mama: Quão longe da realidade?” apresentados 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, 4 de setembro de 2020.

Sofia Mourão Santos
(Sofia Mourão Santos)

Agradecimentos

Aos meus pais, por toda a confiança, carinho, paciência e apoio incondicional desde o primeiro dia.

Ao meu irmão, pelos conselhos, pelo ombro amigo e por todo o apoio e disponibilidade em ajudar sempre que fosse preciso.

Às amigas que Coimbra me deu, por todas as mais belas aventuras partilhadas enquanto descobríamos juntas esta cidade.

Aos amigos de sempre, por aqueles serões de sábado em que partilhávamos as nossas semanas, com direito a conselhos e desabafos que acabavam em gargalhadas reconfortantes.

Às minhas colegas de casa, por todos os serões tão bem passados e por todas as experiências que partilhámos juntas.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, corpo docente e não docente, pelo acolhimento e transmissão de conhecimento, que tornaram a escolha desta instituição na melhor decisão.

À minha orientadora Professora Doutora Ana Miguel Matos, pelas palavras amigas e apoio incansável na realização da minha monografia.

Aos meus orientadores de estágio, Dra. Paula Soares e Dr. Rafael Pereira, por estarem sempre na retaguarda, prontos a ajudar, assim como aos restantes elementos da Farmácia Gaspar e da Farmácia Central Soudos, pela amabilidade e transmissão de conhecimentos.

A Coimbra, à cidade do coração, obrigada por 5 anos que se fizeram sentir a pouco. Realmente o que é bom, acaba depressa.

A todos, o mais sincero obrigada!

Índice

Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária Farmácia Gaspar e Farmácia Central Soudos

Lista de Abreviaturas.....	7
1. Introdução.....	8
2. Análise SWOT.....	9
2.1 Pontos Fortes.....	9
2.1.1 Envolvimento em múltiplas tarefas.....	9
2.1.2 Serviços Farmacêuticos.....	10
2.1.3 Programas de Saúde Pública.....	10
2.1.4 Implementação da Filosofia <i>Kaizen</i>	10
2.1.5 Preparação de Manipulados.....	11
2.1.6 Proximidade com o utente.....	11
2.1.7 Afiliação com outras instituições.....	12
2.2 Pontos Fracos.....	12
2.2.1 Insegurança.....	12
2.2.2 Períodos de Menor Afluência.....	12
2.2.3 Aconselhamento em Dermofarmácia e Cosmética e Preparações de Uso Veterinário.....	12
2.3 Oportunidades.....	13
2.3.1 Formações.....	13
2.3.2 Sifarma 2000® e Novo Módulo de Atendimento.....	13
2.3.3 Vasta gama de Dermofarmácia e Cosmética e Produtos de Uso Veterinário.....	13
2.3.4 Fase de crescimento de uma farmácia.....	14
2.3.5 Pandemia de COVID-19.....	14
2.4 Ameaças.....	15
2.4.1 Pandemia de COVID-19.....	15
2.4.2 Pedido de MSRM sem receita.....	15
2.4.3 Medicamentos Esgotados/Rateados.....	15
2.4.4 Atualização de Preços.....	16
3. Casos Práticos.....	16
4. Conclusão.....	17
5. Bibliografia.....	17

Parte II – Monografia

Viroterapia Oncolítica no Cancro da Mama: Quão longe da realidade?

Resumo.....	19
Abstract.....	19
Lista de Abreviaturas.....	20
I. Introdução - Cancro da mama.....	21
I.1 Epidemiologia.....	21
I.2 Classificação.....	21

1.3 Terapêuticas disponíveis	22
1.3.1 Cancro da mama <i>Hormone Receptor positive</i>	23
1.3.2 Cancro da mama Recetor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano positivo ...	23
1.3.3 Cancro da mama <i>Triple Negative</i>	23
1.4 Células estaminais cancerígenas	24
1.4.1 Células estaminais cancerígenas no cancro da mama	24
1.4.1.1 Resistência à terapêutica.....	25
2. Vírus Oncolíticos	28
2.1 Contexto Histórico.....	28
2.2 Mecanismo de ação	29
2.2.1 Resposta Imune na Viroterapia Oncolítica: As duas faces	29
3. Vírus Oncolíticos no Cancro da mama	30
3.1 Vírus Naturalmente Oncolíticos	30
3.2 Vírus Geneticamente Modificados	32
3.2.1 Otimização da segurança e seletividade tumoral	32
3.2.2 Otimização da Eficácia	38
3.3 Monoterapia na aplicação clínica.....	39
3.4 Terapia combinada	42
3.4.1 Vírus Oncolíticos e <i>Immune Checkpoint Inhibitors</i>	43
3.4.2 Vírus Oncolíticos e Quimioterapia.....	44
3.4.3 Vírus Oncolíticos e Inibidores das Histona Deacetilases	45
3.4.4 Vírus Oncolíticos, Inibidores da Aromatase, <i>Immune Checkpoint Inhibitors</i> e Trastuzumab.	46
3.4.5 Vírus Oncolíticos, Quimioterapia e <i>Immune Checkpoint Inhibitors</i>	47
3.5 Limitações à Viroterapia Oncolítica no Cancro da mama	48
4. Conclusão e Perspetivas Futuras	49
5. Bibliografia	50

PARTE I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Gaspar

Farmácia Central Soudos

Lista de Abreviaturas

EC – Estágio Curricular

FCS – Farmácia Central Soudos

FG – Farmácia Gaspar

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MSRM – Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

I. Introdução

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, termina com a Unidade Curricular mais desafiante de todo o Plano de Estudos: O Estágio Curricular (EC). É neste último posto que realmente somos postos à prova, pondo em prática 4 anos e meio de conhecimentos teóricos, possibilitando um primeiro contacto com o mundo do trabalho. O estágio curricular em Farmácia Comunitária, de carácter obrigatório, é transversal a todos os alunos finalistas. Oferece uma experiência introdutória à realidade da profissão farmacêutica, sendo esta área uma das saídas profissionais mais escolhidas de entre os recém mestrados do MICF. O meu EC realizou-se em duas farmácias.

Em Coimbra tive a oportunidade de estagiar na Farmácia Gaspar (FG), onde realizei 500 horas. Sediada na rua Carlos Seixas, encontra-se próxima do Centro de Saúde de Norton de Matos, tirando partido de uma zona com bastante comércio local, desde pequenas lojas e cafés, ao centro comercial Coimbra Shopping e feira semanal. Esta localização acoplada ao seu horário de funcionamento (9h – 20:30h durante a semana, e 9h – 14h ao sábado, e ainda serviço permanente, 24h, de forma periódica) constituem uma vantagem estratégica ao atrair uma diversidade de utentes à FG. É uma Farmácia de referência na zona e ganhou uma nova roupagem em setembro de 2019. Uma nova gerência levada a cabo pela Dra. Ana Couto (Diretora-técnica) e Dra. Sara Couto (Gestora) tomou as rédeas do novo rumo que a farmácia viria a tomar. A restante equipa da FG é constituída por 3 farmacêuticas, Dra. Paula Soares, Dra. Sofia Sousa e Dra. Ana Rita Rodrigues. Uma equipa que além de experiente é jovem e dinâmica, o que se torna essencial para um saudável ambiente interno, que se transparece na qualidade dos serviços prestados aos utentes.

Mais perto de casa, foi-me possibilitado estagiar na Farmácia Central Soudos (FCS) onde fiz 310 horas, perfazendo as 810 horas do EC. Localiza-se no Largo do Forno na aldeia de Casais de Igreja, concelho de Torres Novas. Detentora de um vantajoso estacionamento, encontra-se adjacente a uma Policlínica com diversas especialidades, e próxima de alguns Centros de Saúde. Esta localização associada ao horário de funcionamento das 9h às 20h de segunda a sábado, permite a amplificação da tipologia de utentes. Apresenta uma equipa constituída por 6 elementos: Dr. Carlos Pereira, Proprietário; Dra. Laurinda Alberto, Diretora-Técnica; Dr. Rafael Pereira, farmacêutico e os técnicos de farmácia Leonel Santos, Henrique Pereira e Isabel Cardoso. Equipa experiente e muito profissional que garante um serviço de qualidade aos seus utentes, essencial para a sua satisfação e fidelização.

O presente relatório tem como objetivo contar a minha experiência durante a realização do EC em Farmácia Comunitária, através de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*). Nesta análise os fatores internos, aspetos intrínsecos à farmácia, que considerei vantajosos – Pontos Fortes (*Strengths*), e outros com impacto menos positivo – Pontos Fracos (*Weaknesses*) assim como os fatores externos, associados ao meio envolvente da farmácia com influência sobre o desempenho do estágio, tanto positiva – Oportunidades (*Opportunities*), das quais se deve tirar proveito, como negativa – Ameaças (*Threats*), que podem pôr em causa o bom funcionamento do estágio.

2. Análise SWOT



Figura 1. Estrutura síntese da minha análise SWOT.

2.1 Pontos Fortes

2.1.1 Envolvimento em múltiplas tarefas

Durante o meu EC procurei fazer um horário alargado. Isto possibilitou-me contactar com diversas tarefas ao longo do dia, desde assistir a abertura da farmácia acompanhando o início do sistema, à receção, conferência e arrumação de encomendas, observação dos diferentes tipos de utentes ao longo do dia e ainda fazer parte integrante do fecho da farmácia. Alguns dias por semana fui responsável por fechar a caixa do ‘estagiário’, sendo que no caso

de a contagem dar mal, tinha de procurar perceber o porquê e corrigir. Realizei ainda algumas horas de uma noite de serviço e fiz parte de reuniões de equipa e *brainstorm* de ideias para dinamizar a farmácia.

2.1.2 Serviços Farmacêuticos

A diversidade de serviços prestados no decorrer do estágio constituiu efetivamente um ponto forte. Desde a medição da pressão arterial, à determinação de parâmetros bioquímicos como glicémia capilar, triglicéridos e colesterol total foram requisitos constantes. Fui tornando-me cada vez mais autónoma na prestação destes serviços, permitindo-me ainda estabelecer uma conversa com os utentes sobre os seus estilos de vida a fim de, se necessário, aconselhar acerca de medidas benéficas à sua saúde. Contactei ainda com o serviço de nutricionista semanal e de preparação individualizada do medicamento.

2.1.3 Programas de Saúde Pública

Em colaboração com a VALORMED, ambas as farmácias acolhem a recolha de medicamentos fora de prazo ou já não utilizados, assim como materiais de acondicionamento como embalagens vazias, folhetos informativos, blisters e bisnagas [1]. Com contentores específicos distribuídos pela sala de atendimento, os utentes podem usufruir deste programa, tendo acesso aos contentores com apoio da equipa, que deve sempre que possível confirmar que os resíduos entregues estão abrangidos pela licença atribuída à VALORMED. Quando cheios, estes mesmos contentores são selados sendo posteriormente recolhidos pelos armazenistas [2]. Contactei ainda com o Programa de Troca de Seringas (PTS), cujo objetivo é a prevenção e diminuição da prevalência de infeções pelo VIH e os Vírus da Hepatite B e C por via sexual, endovenosa e parentérica. Este programa consiste na entrega a «Pessoas que Utilizam Drogas Injetáveis» (PUDI) de um Kit ‘Redução de Riscos’, composto por duas seringas e agulhas, um preservativo, dois filtros, dois toalhetes desinfetantes, dois recipientes, duas ampolas de água bidestilada e duas carteiras de ácido cítrico, em troca de seringas utilizadas [3].

2.1.4 Implementação da Filosofia Kaizen

O termo *Kaizen* provém da cultura japonesa e significa ‘Mudar para melhor’ (*Kai* = Mudar, *Zen* = Para melhor). Traduz-se numa filosofia de melhoria contínua para a inovação, excelência e rentabilidade de uma empresa, neste caso a farmácia comunitária. Neste almejar pela melhoria contínua é essencial a eliminação de desperdícios que não acrescentam valor à

farmácia e que podem comprometer o progresso da mesma [4]. O início do meu estágio coincidiu com a implementação desta filosofia, sendo-me possível acompanhar a sua evolução.

De entre as medidas adotadas que presenciei, fundamentadas nesta filosofia, destaco a criação de um quadro *Kaizen*, afixado numa zona de passagem no *back-office*, de forma a estar visível a todos os colaboradores. Neste quadro são afixados pontos como o mapa de tarefas da equipa, sugestões de melhoria e objetivos semanais/mensais. Também se adotou a realização semanal de reuniões de equipa comandadas sempre por um elemento diferente e por vezes acompanhada pela consultora da Glintt, responsável pela implementação desta filosofia na farmácia.

2.1.5 Preparação de Manipulados

Hoje em dia, e associado ao enorme peso das indústrias farmacêuticas, os medicamentos manipulados têm sido cada vez menos receitados e conseqüentemente dispensados, tendo a sua preparação diminuído nas farmácias comunitárias ao longo dos anos. Contudo, senti que tive uma boa experiência neste campo. Além da reconstituição de antibióticos – o mais comum – preparei pomadas de enxofre e ainda múltiplas soluções antissépticas de base alcoólica (SABA), as quais com o tempo desenvolvi de forma autónoma. Acoplada à sua preparação, existe ainda o preenchimento de alguns formulários, como os de dispensa de matérias primas e ficha de preparação do medicamento manipulado realizando-se nesta última a dedução do preço final.

2.1.6 Proximidade com o utente

Ao realizar parte do estágio num ambiente mais rural e familiar, foi-me possível constatar que a maioria dos utentes eram habituais e fidelizados à farmácia. Isto permite que os seus atendimentos sejam mais personalizados e, de certa forma, mais acessíveis dado o acompanhamento regular da medicação destes utentes. Acontece ainda que a maior parte destes utentes fidelizados são idosos, caracterizados pelo regime medicamentoso complexo, com maior tendência para cometer erros. Contudo, graças à proximidade e confiança que depositam, apresentam-se mais recetíveis ao aconselhamento de adoção de estratégias de otimização da adesão terapêutica. Outro ponto comprovativo desta proximidade dos utentes é o de haver *stock* mínimo em determinados produtos que por norma são destinados a utentes que os fazem num regime contínuo.

2.1.7 Afiliação com outras instituições

No decorrer do meu EC contactei com a afiliação com diferentes instituições como Lares de Idosos e Centros de Dia de localidades próximas. Em registo periódico as instituições comunicam à farmácia a medicação e outros produtos necessários a determinado utente. A equipa analisa o pedido procedendo à sua dispensa e entrega. Considerei de imediato um ponto forte por ser a primeira vez a realizar este serviço o que me permitiu contactar de forma mais regular com determinados grupos de medicamentos, respetivas dosagens e posologias assim como otimizar o meu conhecimento relativamente à associação princípio ativo – nome comercial.

2.2 Pontos Fracos

2.2.1 Insegurança

Apesar de já ter tido a oportunidade de estagiar em Farmácia Comunitária num contexto de estágio extracurricular, e de ter assistido a muitos atendimentos no início do estágio, foi notória a insegurança inicial. Acoplada à dificuldade de associar alguns princípios ativos às marcas comerciais e adaptação ao sistema informático, situações distintas da dispensa de medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) suscitaram-me alguma insegurança nos meus atendimentos. No entanto, fui sempre acompanhada por excelentes equipas, apoiando-me nas dúvidas que apresentava. Esta insegurança foi se desvanecendo, muito graças a eles.

2.2.2 Períodos de Menor Afluência

Durante o primeiro mês do meu estágio foram um pouco frequentes a existência de períodos com menor afluência. As causas por trás disto incluem fatores como as condições climáticas adversas características dos primeiros meses do ano e o decorrer de obras na via pública durante um longo período. Contudo, como estes períodos se fizeram notar mais na primeira parte do meu estágio, permitiu-me assistir a cada atendimento de forma calma e atenta, explorar as diferentes gamas de produtos procurando compreender como os produtos estavam expostos, assim como a informação científica dos medicamentos, que me possibilitou adquirir e consolidar conhecimentos, preparando-me para as próximas partes do estágio.

2.2.3 Aconselhamento em Dermofarmácia e Cosmética e Preparações de Uso Veterinário

Ao iniciar o estágio, senti que as minhas bases no âmbito da Dermofarmácia e Cosmética e Preparações de Uso Veterinário (PUV) encontravam-se pouco consolidadas para

o aconselhamento ao público. Tanto pela complexidade que ambas as matérias envolvem, mas também pela superficialidade com que estes temas foram abordados no plano curricular, principalmente no âmbito da veterinária. Considero que PUV é uma unidade curricular que deve ser repensada no sentido de adquirir uma vertente mais direcionada ao aconselhamento em farmácia comunitária.

2.3 Oportunidades

2.3.1 Formações

A profissão farmacêutica, enquanto profissão de saúde, não estagna. Requer constante atualização de conhecimentos de forma a responder às constantes novidades no quotidiano de um agente da saúde pública. No decorrer do meu estágio tive a oportunidade de participar em diversas formações promovidas por entidades comerciais, quer na própria farmácia (Pharma Nord, Zambon, Advancis, Glintt) quer fora das instalações (Skinceuticals, Fresubin, Pharma Nord, ANF – Patta). Estas contribuíram para a consolidação de determinados temas, adquirindo mais confiança no seu aconselhamento.

2.3.2 Sifarma 2000[®] e Novo Módulo de Atendimento

Ao longo do meu estágio tive a oportunidade de contactar com os dois programas de atendimento: Sifarma 2000[®] e Novo Módulo de Atendimento do Sifarma[®].

O Sifarma 2000[®] é o sistema mais utilizado e familiarizado pelos farmacêuticos a nível nacional. Contudo, o novo sistema surge com o objetivo de tornar muitos dos processos do atendimento mais simples, associados a um grafismo mais intuitivo e apelativo, permitindo assim um atendimento mais rápido e eficiente. Além disso, ao contrário do programa anterior o Novo Módulo de Atendimento permite criar campanhas promocionais internas, adicionar novos componentes em qualquer fase do atendimento, gerir mais facilmente documentos de faturação (separar faturas por IVA, por nome de utente, ou por produtos), associar diferentes utentes à mesma venda e possibilita ainda uma melhor relação com o cartão Saúde.

Considero o contacto com os dois programas uma vantagem futura na medida em que me encontro confortável em trabalhar com os dois programas de atendimento.

2.3.3 Vasta gama de Dermofarmácia e Cosmética e Produtos de Uso Veterinário

Apesar de algumas lacunas que senti em termos de conhecimento científico nestas matérias, contactei com vastas gamas de produtos nas duas áreas durante o estágio. O facto de contactar com diversos produtos, de a procura para os mesmos ser muita e de ter sempre

uma equipa pronta a esclarecer as minhas dúvidas e corrigir os meus erros, deu-me a confiança necessária para evoluir nestes dois campos e otimizar o meu atendimento. Dentro dos produtos de uso veterinário ainda tive oportunidade de contactar com variadas situações, não só sobre animais de companhia, mas também sobre animais de produção.

2.3.4 Fase de crescimento de uma farmácia

Nos primeiros meses do meu estágio tive a oportunidade de contactar com o período de ‘reação’ de uma farmácia a uma nova gerência. Esta situação foi acompanhada de estratégias para fazer crescer a farmácia, desde a renovação gradual das instalações, novos e melhores serviços e amplificação da gama de produtos. Assim foi-me possibilitado contactar com a fase ascendente de uma farmácia, quer a nível financeiro e as estratégias a adotar nesse campo, quer na elevação do seu estatuto e reconquista da confiança de antigos utentes.

2.3.5 Pandemia de COVID-19

Ao longo do estágio contactei com diferentes fases da pandemia: Pré-confinamento e Pós-confinamento.

No período inicial, o surgimento do novo coronavírus, em meio de farmácia comunitária permitiu-me fazer parte integrante da dinâmica envolvida na adoção de medidas de segurança perante uma pandemia mundial. Possibilitou-me ganhar responsabilidade e autonomia na gestão de encomendas e reservas de máscaras e álcool gel assim como contactar diversos fornecedores na tentativa de adquirir o que os utentes pretendiam. Todo este cenário proporcionou-me ainda ganhar confiança no atendimento, ao informar os utentes das medidas de segurança a adotar e ainda aconselhar no âmbito dos suplementos vitamínicos no reforço do Sistema Imunitário

Num período pós-confinamento, tive a oportunidade de presenciar o mecanismo de resposta da farmácia comunitária perante a segunda fase da pandemia no país, o estado de calamidade. Da mesma forma foi possível observar a forma como os próprios utentes agiam neste novo cenário, com a imposição da utilização de máscaras, desinfecção à entrada e distanciamento físico como forma de impedir a propagação do vírus, alertando destes cuidados aos utentes que não cumprissem com estas normas.

2.4 Ameaças

2.4.1 Pandemia de COVID-19

Além ter considerado este mesmo ponto uma oportunidade o que efetivamente foi, a partir de um determinado ponto de vista, também constituiu uma ameaça. Conduziu à estagnação dos atendimentos, no sentido em grande parte destes foram constituídos por quase exclusivamente máscaras, álcool gel e luvas, que se encontravam muitas vezes esgotados, levando ao descontentamento por parte dos utentes. Contribuiu ainda para a diminuição da frequência da medição de parâmetros fisiológicos assim como as consultas de nutrição e dietética que só iniciaram algum tempo depois do início do desconfinamento.

2.4.2 Pedido de MSRM sem receita

Durante o meu estágio foram ainda alguns os casos em que os utentes solicitaram antibióticos argumentando “É só para ter de reserva em casa”, benzodiazepinas sem receita médica e outros MSRM. Nestas situações é essencial uma abordagem clara e esclarecedora do porquê de determinados medicamentos não poderem ser cedidos sem receita e acompanhamento médico, com visão na promoção do uso racional dos medicamentos. Nem todos os utentes se demonstravam recetivos, argumentando que poderiam muito bem ir a outra farmácia. Estas situações colocavam-me enquanto estagiária numa posição difícil, ao causarem alguma tensão no ambiente da sala de atendimento ao público.

2.4.3 Medicamentos Esgotados/Rateados

Durante o estágio contactei com a falta de determinados medicamentos, quer por estarem rateados ou até mesmo esgotados. Os medicamentos rateados são aqueles que se encontram em quantidade limitada nos armazenistas. Desta forma os distribuidores têm de racionar o número de embalagens a enviar a cada farmácia, não satisfazendo necessariamente as suas necessidades. Nos medicamentos esgotados há uma falha na produção dos próprios laboratórios ou descontinuação dos produtos.

Estas situações fazem com que o farmacêutico tenha de explicar de forma esclarecedora o porquê de não ter os medicamentos pedidos pelos utentes, sugerindo alternativas equivalentes. Contudo, os utentes ficam naturalmente descontentes, e por vezes não compreendendo, duvidam da credibilidade e assumem falta de gestão e pouco profissionalismo por parte da farmácia. Desta forma, estas situações comprometem a relação farmacêutico-utente assim como a própria gestão do stock da farmácia.

2.4.4 Atualização de Preços

Os preços dos medicamentos genéricos e o valor das comparticipações dos medicamentos de marca são revistos e atualizados a cada 3 meses pelo Sistema Nacional de Saúde. Desta revisão resultam alterações por vezes acentuadas no seu valor. Um caso especial desta alteração de preços é a queda significativa do valor de comparticipação de um medicamento original, aquando do lançamento do seu primeiro genérico.

Estas oscilações de preços comprometem a confiança do utente com o farmacêutico e estagiários em particular, assumindo que é a farmácia que faz estas alterações. Esta desconfiança tem tendência a ocorrer principalmente em utentes idosos com um regime medicamentoso crónico.

3. Casos Práticos

1) Um jovem de 20 anos dirige-se à farmácia e pede um 'spray para o nariz'. Questionei se sentia o nariz a pingar ou entupido. Respondeu que tinha o nariz entupido, seco e como estava continuamente a assoar-se sentia a mucosa nasal ferida, assim como a zona externa do nariz. Perante o exposto questionei se fazia algum tipo de alergia que conhecesse e se fazia outro tipo de medicação, ao quais obtive resposta negativa. Assim sendo, aconselhei a utilização de Vibrocil Actilong Protect[®]. A sua composição combinada do cloridrato xilometazolina, vasoconstritor tópico indicado para a congestão nasal, com dexpanthenol, protetor, hidratante e regenerador da mucosa, é ideal para a situação em causa. Analisando ainda o que o utente falou sobre a zona externa do nariz aconselhei um bálsamo reparador e calmante: La Roche Posay Cicaplast B5[®]. Indiquei que deve fazer uma pulverização em cada narina (com a cabeça ligeiramente inclinada para a frente) até 3 vezes ao dia durante não mais que 5 dias. O bálsamo poderia aplicar 2 vezes ao dia até melhorias. O utente aceitou as minhas indicações e levou os dois produtos.

2) Uma senhora com cerca de 40 anos dirige-se à farmácia com uma receita médica para Fosfomicina 3000 mg, requisitando Monuril[®]. Após questioná-la se tinha muita sintomatologia, com um ar desconfortável confidencia-me que tem vontade constante de ir à casa de banho e com muito ardor a urinar. Acrescenta que lhe acontece muitas vezes ao longo do ano, mesmo aplicando as medidas não farmacológicas que lhe têm sido aconselhadas, como beber muita água e evitar estar muito tempo de bexiga cheia. Perante a situação, informei acerca da opção de fazer em conjunto com o Monuril[®], o suplemento Advancis[®] Uritabs. Este apresenta na sua composição FOS (fruto-oligossacarídeos – pré-bióticos), extratos de uva-ursina (ação antibacteriana, anti-inflamatória e diurética) e arando vermelho (impede a adesão das bactérias

ao urotélio conduzindo à expulsão das bactérias através da urina). Recomendei fazer o Monuril[®] de estômago vazio, de preferência ao deitar após esvaziar a bexiga, deixando atuar durante a noite. O Advancis[®] Uritabs, em situação de crise sintomatológica, é indicado segundo a posologia 2.0.2, não devendo ser tomado em jejum. Num período preventivo a posologia a adotar é 1.0.0.

4. Conclusão

O estágio curricular em farmácia comunitária sem dúvida que constituiu uma etapa desafiante no culminar do meu percurso académico. Permitiu-me contactar com as mais diversas situações, que para além de exigirem a aplicação dos meus conhecimentos adquiridos durante os anos de formação, contribuíram para o meu crescimento pessoal, adquirindo competências como proatividade, comunicação e empatia.

No decorrer do meu estágio tive o privilégio contactar com excelentes profissionais que foram sem dúvida essenciais na minha orientação e formação. O sentimento de integração e saber que tinha uma equipa para me apoiar em qualquer situação que surgisse, foi sem dúvida fundamental para a aquisição da confiança necessária para sair bem-sucedida nos meus atendimentos, sempre com vista ao bem-estar do utente.

Finalizo esta etapa confiante e motivada para o futuro que se avizinha, na busca incessante por novas aprendizagens.

5. Bibliografia

[1] VALORMED - **Cidadão e comunidade**. [Acedido a 5 de julho de 2020]. Disponível na Internet: <http://www.valormed.pt/paginas/12/spancidadaospan-e-comunidade>

[2] VALORMED - **Qualidade e ambiente. Manual de Procedimentos da Farmácia Comunitária**. [Acedido a 5 de julho de 2020]. Disponível na Internet: <http://new.valormed.pt/assets/stores/1041/userfiles/SGQA/PCIA.01.04%20MANUAL%20DE%20PROCEDIMENTOS%20DA%20FARMACIA%20COMUNITARIA.pdf>

[3] SERVIÇO NACIONAL DE SAÚDE - **Programa de Troca de Seringas**. [Acedido a 5 de julho de 2020]. Disponível na Internet: <https://www.sns.gov.pt/noticias/2016/09/02/programade-troca-de-seringas/>

[4] KAIZEN INSTITUTE – **Significado de kaizen**. [Acedido em 6 de julho de 2020] Disponível na Internet em: <https://pt.kaizen.com/sobre-nos.html>

D5FH9'≈%

Monografia

“Viroterapia Oncolítica no Cancro da Mama: Quão longe da realidade?”

Resumo

O cancro da mama é o tipo de cancro mais comum entre a população feminina a nível mundial. Encontram-se disponíveis várias terapias, adequadas a cada subtipo do cancro da mama, na tentativa de se adaptarem à individualidade de que cada um. Contudo, o desenvolvimento de resistências combinado com o impacto dos efeitos adversos tem resultado no seu insucesso a longo prazo, responsável por fenómenos de recorrência e metastização. Perante esta adversidade na terapêutica do cancro da mama, surgiram os vírus oncolíticos. O seu mecanismo de ação único, que permite a destruição da massa tumoral sem comprometer a integridade das células saudáveis, atuando de forma diferente das terapias convencionais do cancro da mama, torna a viroterapia oncolítica numa alternativa promissora. Muitos são os ensaios pré-clínicos e clínicos, quer em monoterapia como terapia combinada com outros agentes antineoplásicos, que têm apresentado resultados que, apesar de por vezes serem pouco representativos demonstram um grande potencial. Otimizando parâmetros como a via de administração, biossegurança e a tipologia da população em estudo, a viroterapia oncolítica promete tornar-se numa realidade muito em breve.

Palavras-chave: Cancro da Mama, Células Estaminais Cancerígenas, Vírus Oncolíticos, Viroterapia Oncolítica, Engenharia Genética.

Abstract

Breast Cancer is the type of cancer most common among women worldwide. There are multiple therapies available for each breast cancer subtype, in an attempt to adapt to the individuality of each one. However, resistance development combined with the impact of the adverse effects result in treatment failure on the long run, being accountable for recurrence and metastasis. Facing this adversity in breast cancer therapy, oncolytic virus arose. Their unique mechanism of action that allows tumor destruction without compromising healthy cells, acting differently from conventional therapies, makes oncolytic virotherapy a refreshing alternative. There are a plethora of pre-clinical and clinical studies, either as monotherapy or combined therapy with other antineoplastic agents that have been reporting promising results, apart from their modest representativeness. After optimizing defining matters such as administration route, biosafety and type of study population, oncolytic virotherapy may not be far from becoming a reality.

Keywords: Breast Cancer, Cancer Stem Cells, Oncolytic Virus, Oncolytic Virotherapy, Genetic Engineering.

Lista de Abreviaturas

(B)CSC – *(Breast) Cancer Stem Cell*
Ad – Adenovírus
AI – Inibidores da Aromatase
ALDH – Aldeído desidrogenase
APC – *Antigen-presenting cell*
DAMP – *Damage-Associated Molecular Pattern*
DC – *Dendritic Cell*
EMA – *European Medicines Agency*
EMT – *Epithelial-Mesenchymal Transition*
ERBB2⁽⁺⁾ – *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (positive)*
ER α – Recetor α de estrogénios
FDA – *Food and Drug Administration*
H-IPV – H-I Parvovírus
HDAC(i) – *Histone Deacetylase (inhibitor)*
HIFs – *Hypoxia Inducible Factors*
HR⁺ – *Hormone Receptor Positive*
HSV-I – *Herpes Simplex Vírus-I*
ICD – *Immunogenic Cell Death*
ICI – *Immune Checkpoint Inhibitor*
IFN – Interferão
IT – Intratumoral
IV – Intravenosa
MET – *Mesenchymal-Epithelial Transition*
NK – *Natural Killer*
oReo – *Oncolytic Reovirus*
OV – *Oncolytic Virus*
OVT – *Oncolytic Virotherapy*
PAMP – *Pathogen-Associated Molecular Pattern*
PKR – *Protein Kinase R*
PR – Recetor de Progesterona
pRb – *Proteína Retinoblastoma*
ROS – *Reactive Oxygen Species*
RR – *Ribonucleotídeo Redutase*
TNBC – *Triple Negative Breast Cancer*
TSP – *Tissue Specific Promoter*
VEGF – *Vascular endothelial growth factor*
VV – *Vírus Vaccinia*

I. Introdução - Cancro da mama

I.1 Epidemiologia

O cancro da mama é o tipo de cancro mais comum entre a população feminina, afetando cerca de 2.1 milhões de mulheres todos os anos, a nível mundial. Dados recentes revelam que só no ano de 2018, 627.000 mulheres morreram de cancro da mama (WHO, 2020).

Em Portugal, uma análise estatística realizada entre 2010 e 2015, permitiu inferir que a taxa de mortalidade no cancro da mama estabilizou neste período, contabilizando 1.660 mortes em 2014 (MIRANDA *et al.*, 2016), com um aumento discreto para 1.683 em 2015, tornando Portugal dos países com a mortalidade mais reduzida, comparativamente com os valores da União Europeia (DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE, 2017). A taxa de incidência tem vindo a crescer com o aumento do número de casos diagnosticados, muito devido ao crescimento dos programas de rastreio do cancro da mama (MIRANDA *et al.*, 2016). As taxas de cobertura geográfica destes programas têm vindo a ter uma tendência muito positiva sendo uma meta para 2020 a expansão desta cobertura para os 100% (DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE, 2017). O rastreio revela-se de extrema importância, uma vez que o diagnóstico tardio terá repercussões na eficácia do tratamento. Muito por causa da probabilidade elevada de formação de metástases, mas em parte também porque uma doença como o cancro, numa fase mais avançada requer um tratamento mais intenso, que pode só por si, levar a intolerância ao tratamento e consequências mais graves (DEY, RATHOD e DE, 2019).

I.2 Classificação

O cancro da mama pode ser classificado em 5 estágios anatómicos (0 – IV). Esta classificação baseia-se no nível de invasão da doença, no tamanho do tumor, no nível de envolvimento dos nódulos linfáticos e pelo facto de se ter espalhado ou não para outros órgãos no corpo. O carcinoma da mama não invasivo, que se encontra na sua localização original classificar-se-á como no estágio 0, enquanto um estágio IV vai caracterizar um tumor invasivo que se expandiu para lá do tecido mamário (ARAB *et al.*, 2019).

Quanto à expressão de determinados recetores moleculares nas células cancerígenas da mama, esta doença pode classificar-se em 3 subtipos. Para esta classificação, foram identificados 2 alvos moleculares na patogénese do carcinoma da mama (WAKS e WINER, 2019).

O recetor α de estrogénios (ER α), expresso em 70% dos carcinomas da mama invasivos, é um recetor hormonal esteróide e fator de transcrição que, quando ativado pelo

estrogénio, vai acionar vias de sinalização oncogénicas nas células cancerígenas. A expressão dos recetores de progesterona (PR), também recetores hormonais esteróides, é igualmente um marcador de sinalização do ER α . Tumores que expressem recetores de estrogénio ou de progesterona em pelo menos 1% das células tumorais são classificados como *Hormone Receptor positive* (HR⁺) (WAKS e WINER, 2019).

O segundo alvo molecular é o recetor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (ERBB2 – conhecido também por HER2 – *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*). É um recetor transmembranar tirosina-cinase, da família dos recetores dos fatores de crescimento epidérmico, que se encontra sobre expresso entre 15% a 20% dos carcinomas mamários (WAKS e WINER, 2019). Carcinomas com sobre expressão do ERBB2 são classificados como ERBB2⁺ e caracterizam-se por serem mais agressivos e de rápido crescimento, uma vez que a célula cancerígena vai receber mais fatores de crescimento, acabando por se associar a um pior prognóstico (WAKS e WINER, 2019) (TANG *et al.*, 2016).

O terceiro subtipo, caracterizado pela ausência de expressão dos recetores moleculares ER α , PR e ERBB2, denomina-se *Triple Negative Breast Cancer* (TNBC). Abrange cerca de 15% de todos os carcinomas da mama, e é considerado o subtipo mais heterogéneo com um risco elevado de recorrências (WAKS e WINER, 2019).

1.3 Terapêuticas disponíveis

Para carcinomas na mama não metastáticos o principal objetivo consiste em erradicar o tumor, da mama e nódulos linfáticos regionais se for o caso, e prevenir a recorrência metastática. Há dois tipos de terapia a considerar, de acordo com a área abrangida: terapia localizada e sistémica (WAKS e WINER, 2019).

A terapia localizada inclui a ressecção cirúrgica e remoção dos nódulos linfáticos axilares podendo associar-se radioterapia adjuvante. No caso de uma ressecção cirúrgica com conservação da mama (lumpectomia), radioterapia adjuvante é normalmente indicada, prevenindo a ocorrência de recidivas (WAKS e WINER, 2019).

A terapia sistémica pode ser neoadjuvante (pré-cirúrgica), adjuvante (pós-cirúrgica) ou ambas (WAKS e WINER, 2019). A decisão de adotar um tratamento sistémico (neo)adjuvante deve-se basear na previsão de sensibilidade para os vários tipos de terapêutica, no seu benefício e no risco de recaída do doente em questão. Deve-se ter em conta ainda as previsões de toxicidade a curto e longo prazo, a idade do doente, o seu estado geral de saúde e as suas preferências (CARDOSO *et al.*, 2019).

Cada uma das terapias sistémicas a seguir apresentadas são adequadas a cada subtipo.

1.3.1 Cancro da mama *Hormone Receptor positive*

No contexto do cancro da mama HR⁺ a terapia primária é endócrina. O primeiro agente terapêutico a surgir nesta área foi o Tamoxifeno, modulador seletivo dos recetores de estrogénio que inibe competitivamente a ligação dos estrogénios ao recetor nas células da mama. Ao longo do tempo foram surgindo outros agentes como os Inibidores da Aromatase (AI – *Aromatase Inhibitors*), que diminuem a concentração plasmática de estrogénio ao inibirem a conversão dos androgénios a estrogénios (WAKS e WINER, 2019). Para mulheres em pré-menopausa a terapêutica de eleição é o Tamoxifeno. Na pós-menopausa a terapia padrão inclui normalmente AI e Tamoxifeno (CARDOSO *et al.*, 2019).

Um outro agente terapêutico é o Fulvestrant, capaz de degradar seletivamente os recetores de estrogénio. Este fármaco constitui uma alternativa clínica perante o insucesso dos dois agentes anteriores (RODRIGUEZ *et al.*, 2019).

Durante a terapia endócrina poderá ser vantajoso em determinado momento adicionar quimioterapia à estratégia terapêutica. Esta decisão vai depender do risco de recaída do doente, do tamanho do tumor e propriedades associadas à sua agressividade biológica (estágio anatómico, proliferação, invasão vascular), da resposta presumível à terapêutica endócrina e das preferências do doente (CARDOSO *et al.*, 2019). A combinação terapia endócrina/quimioterapia, tem-se demonstrado essencial na prevenção das recorrências em muitos doentes com cancro da mama no estágio I-III (WAKS e WINER, 2019).

1.3.2 Cancro da mama Recetor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano positivo

No cancro da mama ERBB2⁺ é aplicada uma terapêutica que se revelou um dos maiores avanços no âmbito da terapia no cancro da mama. Trastuzumab, é um anticorpo monoclonal humanizado que, ao ligar-se ao domínio extracelular do recetor transmembranar ERBB2, vai desencadear a paragem do ciclo celular na fase G₁. Enquanto este mecanismo se processa, Trastuzumab vai ainda acionar uma resposta imune de forma a destruir a célula cancerígena (TANG *et al.*, 2016). Esta terapia inovadora é ainda acompanhada de quimioterapia (WAKS e WINER, 2019).

1.3.3 Cancro da mama *Triple Negative*

Na ausência de expressão de ER α , PR ou ERBB2, isto é, perante o subtipo TNBC, a quimioterapia é a única opção de tratamento sistémico disponível, dado o seu carácter heterogéneo. Assim, TNBC é reconhecido por apresentar o pior prognóstico (WAKS e WINER, 2019).

É de ressaltar que cada caso é único e as decisões relativas à escolha da terapêutica mais indicada podem mudar, uma vez que fatores como o subtipo, o estágio anatómico e as preferências do doente são elementos chave na determinação da estratégia terapêutica individualizada (WAKS e WINER, 2019).

Mesmo tendo em conta todas estas diferentes estratégias de tratamento apresentadas, o desenvolvimento de resistência ao tratamento é comum em todos os subtipos de cancro da mama. De facto, tem sido observado que o mesmo tumor pode ser resistente a múltiplas estratégias de tratamento (TANG *et al.*, 2016).

O facto das várias opções de tratamento por vezes não resultarem, veio levantar a hipótese de existir uma determinada população de células, integradas no meio heterogéneo do tumor, que exibem fenótipos de resistência, capazes de favorecer a metastização e aumentar o potencial de recorrências (BAI *et al.*, 2018). Alguns autores têm vindo a propor que as células estaminais cancerígenas (*Cancer Stem Cells* – CSC) desempenham um papel importante nas recorrências pós-tratamento e que contribuem para a natureza incurável do cancro da mama (LI *et al.*, 2012).

1.4 Células estaminais cancerígenas

As células estaminais normais apresentam três propriedades únicas: Autorrenovação, diferenciação e manutenção deste equilíbrio, regulando de uma forma estrita o número de células estaminais (DAWOOD *et al.*, 2014).

As células estaminais cancerígenas (CSC) constituem uma pequena parte da população de células num tumor e são referenciadas como '*tumor initiating cells*' ou 'células tumorigénicas'. Tal como as células estaminais normais, apresentam a capacidade de autorrenovação e de dar origem a descendência diferente, através de divisão celular assimétrica. Contudo, estes fenómenos não acontecem de forma equilibrada (NGUYEN *et al.*, 2010) (DAWOOD *et al.*, 2014).

As células estaminais normais e cancerígenas apresentam ainda a característica comum de se tornar dormentes/quiescentes (ficam em fase G_0 do ciclo mitótico) por longos períodos de tempo (DE ANGELIS, FRANCESCANGELI e ZEUNER, 2019).

1.4.1 Células estaminais cancerígenas no cancro da mama

A existência de CSC em tumores foi demonstrada pela primeira vez no cancro da mama, passando a ser referenciadas como BCSC (*Breast Cancer Stem Cells*) neste contexto tumoral. AL-HAJJ *et al.* (2003) demonstraram que células com o fenótipo $CD44^+CD24^{-/low}$, isoladas de doentes com cancro da mama, apresentam capacidade de iniciar o desenvolvimento

tumoral quando transplantadas em modelos animais. Esta equipa reportou que cerca de 100 células com este fenótipo foram capazes de iniciar crescimento tumoral, enquanto milhares de células cancerígenas com outro fenótipo não conseguiram (AL-HAJJ *et al.*, 2003).

Mais tarde, GINESTIER *et al.* (2008) demonstraram que as células do cancro da mama com atividade aumentada da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) apresentam propriedades de células estaminais, estando associadas a um pior prognóstico. Detetaram ainda no mesmo estudo que um determinado conjunto de células neoplásicas continha os dois fenótipos: CD44⁺CD24^{-low} e ALDH⁺. Apesar de constituírem cerca de 1% da população tumoral, demonstraram ter uma capacidade tumorigénica muito elevada, sendo capazes de iniciar o desenvolvimento tumoral a partir de apenas 20 células (GINESTIER *et al.*, 2008).

Através da avaliação destes fenótipos foi possível ainda confirmar o elevado grau de plasticidade, intrínseco às BCSC (DE ANGELIS, FRANCESCANGELI e ZEUNER, 2019). A caracterização dos marcadores das BCSC permitiu demonstrar a presença destas células em dois estados: *Epithelial-Mesenchymal Transition* (EMT) e *Mesenchymal-Epithelial Transition* (MET). Para provar isto, LIU *et al.* (2014) demonstraram que os fenótipos de BCSC, CD44⁺CD24^{-low} e ALDH⁺, representavam populações de BCSC em zonas distintas do tumor. As células que apresentavam o fenótipo CD44⁺CD24^{-low} encontravam-se na frente invasiva do tumor evidenciando um fenótipo mesenquimatoso pouco proliferativo, enquanto as células ALDH⁺ se encontravam numa localização mais central com fenótipo epitelial, associado a uma elevada capacidade proliferativa. Numa determinada zona interna do tumor, observaram o *overlap* dos fenótipos (LIU *et al.*, 2014).

A plasticidade intrínseca às BCSC que permite a transição reversiva EMT/MET, revelou-se essencial para que estas células tumorais invadissem e formassem metástases distantes do tumor primário (LIU *et al.*, 2014).

1.4.1.1 Resistência à terapêutica

As BCSC têm demonstrado estar envolvidas nos fenómenos de resistência às diferentes terapêuticas indicadas para os subtipos do cancro da mama supramencionados (ALI *et al.*, 2016) (RODRÍGUEZ *et al.*, 2018). Estas células são mais vastamente estudadas pela resistência que demonstram à quimioterapia e radioterapia, terapêuticas antineoplásicas que acabam por ser transversais aos vários subtipos (LI *et al.*, 2008) (PHILLIPS, MCBRIDE e PAJONK, 2006).

A quimioterapia e radioterapia, consideradas estratégias terapêuticas convencionais no cancro da mama, são direcionadas às células diferenciadas e altamente proliferativas, que constituem a massa volumosa do tumor. Atingindo o DNA, estas terapias induzem apoptose

celular eliminando de forma eficaz as células malignas (ZHAO, 2016). Isto permite explicar o porquê destas terapêuticas convencionais serem inicialmente bem sucedidas no controlo do crescimento tumoral (LI *et al.*, 2008). No entanto, as BCSC, sendo células não diferenciadas e por vezes pouco proliferativas (quando em estado dormente), não são atingidas pelas terapias mencionadas (ZHAO, 2016).

Num contexto normal, em resposta a uma ameaça sobre o DNA celular, qualquer célula do organismo aciona um mecanismo de defesa com a interrupção dos seus mecanismos de divisão celular e ativação dos de reparação celular. As BCSC não são exceção e apresentam uma *DNA Damage Response* muito mais rápida que outros tipos de células mamárias, impedindo que fenómenos de apoptose ocorram. Desta forma, as BCSC adquirem resistência à ameaça genotóxica (PALOMERAS, RUIZ-MARTÍNEZ e PUIG, 2018) (EYLER e RICH, 2009).

As BCSC encontram-se predominantemente em zonas hipóxicas. A hipóxia tem demonstrado estar envolvida no desenvolvimento de resistência à quimioterapia e radioterapia (PALOMERAS, RUIZ-MARTÍNEZ e PUIG, 2018). Os *hypoxia-inducible factors* (HIFs), são fatores de transcrição induzidos pela hipóxia. Estes fatores impedem que ocorra diferenciação celular e inibem fenómenos de apoptose, através da ativação de enzimas de reparação do DNA (VINOGRADOV e WEI, 2012). Além disso, a indução da sua expressão pode estar envolvida em fenómenos EMT, o que ajuda a explicar o aumento do número de CSC num ambiente hipóxico (CONLEY *et al.*, 2012). O oxigénio desempenha um papel importante na formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) que vão mediar os efeitos anticancerígenos da radioterapia. Tensões baixas de oxigénio, no nicho tumoral, vão levar consequentemente a níveis de ROS diminuídos. Níveis baixos de ROS, sugerem igualmente uma sobre expressão de sequestradores de radicais livres. Consequentemente as BCSC encontrar-se-ão protegidas contra a radiação ionizante da radioterapia (ZHAO, 2016).

As BCSC também demonstraram expressar níveis elevados dos transportadores de efluxo. As proteínas transmembranares da família de transportadores 'ATP-Binding Cassette' (ABC) são as peças fulcrais para o efluxo. *Multidrug Resistance Protein 1* (MDR1), *Multidrug Resistance-associated Protein 1* (MRP1) e a bomba de efluxo *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP) são os transportadores mais extensamente estudados e diretamente associados à resistência à terapêutica (ZHAO, 2016). Estes transportadores vão utilizar energia da ligação de ATP e de fenómenos de hidrólise para transportar uma variedade de substratos através das membranas. Estando sobre expressos nas BCSC contribuem para a resistência quimioterápica ao regularem o efluxo de agentes citotóxicos (DE ANGELIS, FRANCESCANGELI e ZEUNER, 2019).

Como já foi mencionado, algumas BCSC apresentam uma elevada expressão da enzima ALDH. Esta encontra-se associada à resistência à quimioterapia, ao inativar metabolicamente quimioterápicos como a ciclofosfamida (PALOMERAS, RUIZ-MARTÍNEZ e PUIG, 2018).

As BCSC, ao resistirem a estas terapias antineoplásicas, vão ser responsáveis por fenómenos de recorrência constituindo a verdadeira ameaça à erradicação tumoral. Estratégias terapêuticas capazes de erradicar estas células poderão prevenir este desfecho (ZHAO, 2016) (PALOMERAS, RUIZ-MARTÍNEZ e PUIG, 2018) (Figura 1).

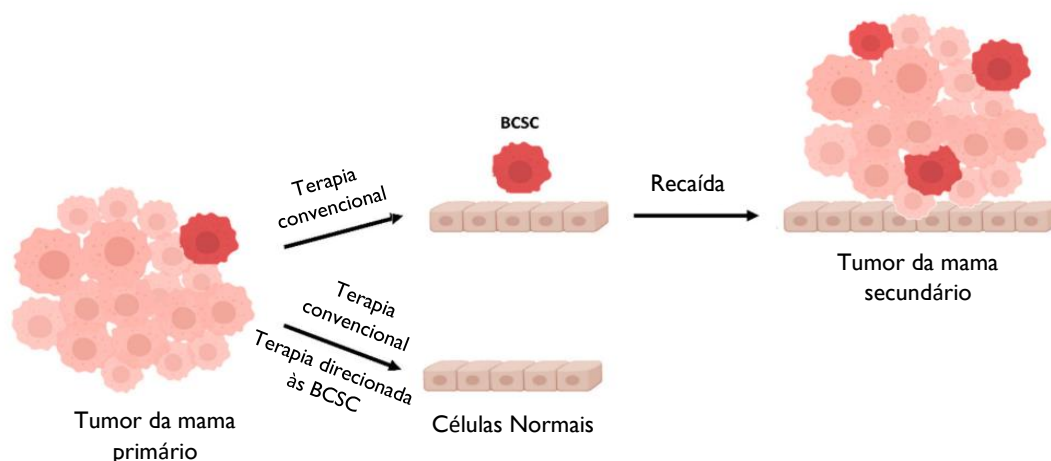


Figura 1. Representação esquemática da heterogeneidade celular na massa tumoral no cancro da mama. O tumor primário apresenta-se composto por células BCSC (formadoras do tumor – representadas a vermelho) e células neoplásicas não-BCSC (constituem o volume tumoral – representadas a rosa). As terapias convencionais destroem as células que constituem a maior parte da massa tumoral, as não-BCSC, altamente proliferativas e diferenciadas, mas as BCSC não são afetadas. Estas células ao permanecerem intactas podem expandir e levar à formação de um tumor secundário, levando a progressão e metastização do tumor. Contudo, se o tumor primário for atingido por terapias direcionadas às BCSC, pode ocorrer a sua erradicação. Adaptado de PALOMERAS, RUIZ-MARTÍNEZ E PUIG, 2018.

Para além do desenvolvimento de resistência às terapêuticas existem efeitos adversos agressivos associados às mesmas terapêuticas antineoplásicas, que comprometem a qualidade de vida do doente. Associados à quimioterapia destacam-se a disfunção neurocognitiva, neuropatia periférica induzida pela quimioterapia e cardiomiopatia (TAO, VISVANATHAN e WOLFF, 2015). Na terapêutica com o anticorpo monoclonal humanizado, como Trastuzumab, destaca-se a cardiomiopatia (LIKANEN *et al.*, 2016). O Tamoxifeno está associado a um risco acrescido de complicações tromboembólicas e hiperplasia endometrial (CARDOSO *et al.*, 2019), enquanto a terapêutica com AIs tem evidenciado perda de densidade óssea e eventos cardiovasculares (FAN *et al.*, 2016).

Perante este cenário, os fenómenos de resistência acoplados aos diferentes efeitos adversos, aumentaram a necessidade de encontrar novas estratégias terapêuticas para ultrapassar estas barreiras (PALOMERAS, RUIZ-MARTÍNEZ e PUIG, 2018).

2. Vírus Oncolíticos

Os vírus oncolíticos (OV – *Oncolytic Virus*) são uma nova estratégia antineoplásica com capacidade destruir células cancerígenas, através de mecanismos que diferem das terapias antineoplásicas convencionais, sem comprometer as células saudáveis. Desta forma as CSC, intrinsecamente resistentes a estas terapias convencionais, podem ser suscetíveis à destruição celular mediada por OVs (EBRAHIMI *et al.*, 2019).

Sendo de atual destaque o papel dos vírus enquanto ameaça à saúde pública é importante avaliar o seu benefício num contexto terapêutico. Com capacidade de infectar as células do organismo, ‘apoderam-se’ da maquinaria celular para se replicar, ultrapassando qualquer mecanismo de defesa celular. No fim de esgotar todos os recursos celulares a seu proveito, lisa a célula hospedeira, libertando a descendência viral para infectar as próximas células. O conceito de viroterapia oncolítica (*Oncolytic Virotherapy* – OVT) baseia-se nestas premissas, que se tornam vantajosas em contexto tumoral (KANEDA e SAGA, 2015).

2.1 Contexto Histórico

Em meados do século XIX, existem registos de doentes oncológicos que passaram por remissão neoplásica, no seguimento de uma infeção viral grave. No final deste século, foi reportado um caso em que uma doente com leucemia entrou em remissão completa, temporária, após uma presumível gripe viral (presumível, uma vez que só cerca de 30 anos mais tarde se identificou o vírus responsável pela gripe) (KELLY e RUSSELL, 2007)(COCKLE e SCOTT, 2017).

No decorrer do século XX, investigadores começaram a administrar de forma intencional, vírus em modelos cancerígenos animais, com o objetivo de avaliar o seu potencial antineoplásico e nos anos 50 iniciaram-se os ensaios clínicos. Apesar de se ter observado regressão tumoral, o sucesso destes ensaios clínicos ficou comprometido ao terem-se reportado resultados erráticos e toxicidade nos tecidos normais, associada à utilização de vírus *wild type*. Mais tarde, a introdução de vírus geneticamente modificados que conseguem atingir especificamente as células cancerígenas sem comprometer as células normais, iniciou uma nova era na OVT (KELLY e RUSSELL, 2007)(COCKLE e SCOTT, 2017).

Em pleno século XXI, T-VEC (Talimogene laherparepvec), um Herpes Simplex Vírus do tipo I geneticamente modificado, foi o primeiro OV a conseguir aprovação regulamentar nos Estados Unidos da América pela FDA (*Food and Drug Administration*) e na União Europeia pela EMA (*European Medicines Agency*), após demonstrar resultados promissores em doentes com melanoma avançado, na fase III do estudo clínico. Este marco veio servir de rampa de

lançamento para o desenvolvimento de novos OV para diferentes tipos de cancro (COCKLE e SCOTT, 2017).

2.2 Mecanismo de ação

Os OV aparentam atuar através de dois mecanismos distintos, no entanto, complementares. Induzem de uma forma direta a lise das células infetadas e estimulam de uma forma indireta o sistema imune (DAVOLA e MOSSMAN, 2019).

O processo oncolítico inicia-se com o contacto entre o vírus e a célula hospedeira. A entrada do vírus na célula começa com a ligação específica das proteínas de adsorção viral, na superfície do vírus, a um determinado recetor na superfície da célula hospedeira. Esta ligação proteína viral – recetor celular, é muito importante na definição do tropismo e especificidade viral. De seguida, o vírus entra na célula e inicia a sua replicação (DIMMOCK *et al.*, 2016).

Como mecanismo de defesa à infeção viral, a célula poderia diminuir o seu metabolismo e até induzir apoptose. No entanto, os OV vão ‘apoderar-se’ da maquinaria celular, permitindo que a sua morte apenas ocorra após terem explorado todos os recursos celulares, para a máxima produção da descendência viral. Após infeção, amplificação viral e indução da morte celular pelo OV, ocorre a lise da célula tumoral (oncólise). Consequentemente, dá-se a libertação da descendência viral infecciosa que se distribui pelas células tumorais adjacentes, com amplificação da oncólise pelas mesmas (RUSSELL, PENG e BELL, 2012).

2.2.1 Resposta Imune na Viroterapia Oncolítica: As duas faces

A segunda parte do mecanismo de destruição das células cancerígenas pelos OV é constituída pela indução da resposta imune. A infeção e lise das células tumorais vão ativar o sistema imune graças à capacidade que os OV têm de induzir morte celular imunogénica (ICD – *Immunogenic Cell Death*) nas células tumorais. Durante este fenómeno, ocorre a exposição e libertação (após a lise) de padrões moleculares associados ao dano celular (DAMPs – *Damage-Associated Molecular Patterns*), e padrões moleculares associados ao agente patogénico (PAMPs – *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) como sinais de perigo, assim como antigénios tumorais e virais. Os DAMPs e PAMPs vão ter um papel crítico na ativação das células apresentadoras de antigénios (APC – *Antigen-Presenting Cell*), células dendríticas (DC – *Dendritic Cell*) na sua maioria. Estas, além de produzirem citocinas pró-inflamatórias vão englobar os antigénios tumorais e virais, apresentando-os às células T *naive*. Com a ativação das células T, principalmente das CD8⁺ citotóxicas, ocorre a geração de uma resposta imune adaptativa, mediando, através do reconhecimento antigénico, a destruição de células tumorais, não só do tumor primário, mas também de metástases existentes. Adicionalmente, também poderá

ocorrer a formação de células T de memória, permitindo uma proteção tumoral perante um cenário de recorrência (FILLEY e DEY, 2017; MARELLI *et al.*, 2018).

As DC antes de induzirem uma resposta imune adaptativa através da ativação das células T CD8⁺ citotóxicas, vão induzir uma resposta imune inata através da ativação das células como as NK (*Natural Killer Cells*). São estes dois tipos de células os mediadores primários do reconhecimento direto e destruição das células neoplásicas (DAVOLA e MOSSMAN, 2019; PRESTWICH *et al.*, 2008).

Apesar de o sistema imune apresentar de facto um papel importante na OVT e na sua eficácia, pode também, no entanto, constituir uma barreira à mesma terapia.

Para os OV obterem o pico da sua ação terapêutica, é essencial que permaneçam tempo suficiente no organismo para que a oncólise, necessária à estimulação da resposta imune de longa duração, ocorra. No entanto, como já seria de esperar em qualquer infeção, é iniciada uma resposta imune contra o próprio vírus, graças à libertação dos antígenos virais, que conduz à sua eliminação. Além disso, se a resposta imune antitumoral resultar na destruição prematura das células tumorais infetadas, pode terminar a infeção viral antes que os efeitos ótimos tenham ocorrido (FILLEY e DEY, 2017).

Quando presentes a nível sistémico após uma administração intravenosa (IV), as partículas virais vão ser imediatamente revestidas por anticorpos neutralizantes (caso estejam presentes), ocorrendo a sua eliminação mediada por proteínas do complemento ao ficarem retidos no fígado ou baço. A presença destes anticorpos neutralizantes e células T específicas para antígenos virais pode ser devida a um contacto prévio com o vírus. Desta forma, o histórico de exposição ao vírus é um dos principais aspetos que contribui para a variabilidade inter-individual na resposta à OVT, principalmente na primeira administração. É de se realçar ainda que a magnitude da resposta à OVT diminui após cada administração, devido à imunidade progressivamente adquirida (RUSSELL e PENG, 2017) (FILLEY e DEY, 2017).

3. Vírus Oncolíticos no Cancro da mama

Transpondo a OVT para a terapêutica do cancro da mama, muitos são os vírus que têm sido alvo de extensa análise. Os OV em estudo classificam-se em vírus naturalmente oncolíticos e vírus geneticamente modificados (COCKLE e SCOTT, 2017).

3.1 Vírus Naturalmente Oncolíticos

Uma vez que as alterações celulares induzidas pela infeção viral são, muitas vezes, semelhantes às alterações celulares adquiridas durante a própria carcinogénese (como inibição

da apoptose e indução da mitose), muitos vírus crescem preferencialmente em células tumorais. Reovírus, e Parvovírus são exemplos de vírus com oncotropismo na sua essência, mais estudados no âmbito do cancro da mama (EVERTS e POEL, 2005) (SURYAWANSHI, ZHANG e ESSANI, 2017).

Reovírus

Pertencente à família *Reoviridae*, os Reovírus são um grupo de vírus não envelopados, cápside icosaédrica e genoma RNA dupla cadeia (dsRNA). Apresentam baixa patogenicidade para o ser humano e são citotóxicos nas células tumorais com a via de sinalização Ras ativada, o que acontece no caso do cancro da mama. Em células saudáveis, os transcritos virais levam à ativação da proteína cinase R (*Protein Kinase R – PKR*), um mecanismo de defesa celular antiviral, resultando na inibição da síntese proteica e da replicação viral. No entanto, células cancerígenas, com a via de sinalização Ras ativada, apresentam uma atividade PKR comprometida, permitindo assim a replicação viral e consequente destruição tumoral (EVERTS e POEL, 2005; HATA *et al.*, 2008; KELLY *et al.*, 2009).

Reovírus do serótipo 3 de natureza oncolítica, por infetar preferencialmente células tumorais, o seu efeito oncolítico nas células do cancro da mama tem sido alvo de vários estudos. Uma equipa testou este reovírus oncolítico (oReo – *oncolytic Reovirus*) (2008) num painel de linhas celulares do cancro da mama, cuja ativação da via de sinalização Ras foi demonstrada. Todas as linhas celulares foram suscetíveis à infeção pelo OV, ocorrendo a replicação viral e atividade citopática. A sobre expressão do ERBB2 através da atividade tirosina-cinase, pode influenciar a via de sinalização Ras mas não se revelou um preditor da suscetibilidade viral ao ocorrer infeção viral nas linhas celulares com e sem sobre expressão do ERBB2. A linha celular controlo, constituída por células epiteliais normais da glândula mamária, não apresentando atividade Ras, mostraram-se resistentes à ação viral (HATA *et al.*, 2008).

MARCATO *et al.* (2009) avaliaram a ação do reovírus, serótipo 3 e estirpe *Dearing in vivo*, em murganhos, com xenoinxertos de amostras de um tumor primário, colhidas de uma doente com cancro da mama. Para além da visível regressão tumoral nos modelos animais, (após administração intratumoral – IT) também foi demonstrado que o OV atingiu e destruiu de forma eficaz as BCSC (identificadas pelo seu fenótipo $CD44^+CD24^{-low}ALDH^+$), na mesma amostra tumoral. Assim foi possível acompanhar a destruição destas células, que se deu ao mesmo ritmo que as células neoplásicas não-BCSC (que constituem a maior parte da massa tumoral), uma vez que ambas as células (BCSC e não-BCSC) apresentaram a via de sinalização Ras ativada, sendo mais suscetíveis à infeção viral. Foi possível concluir que o OV em estudo

apresenta potencial para induzir a regressão tumoral num cenário clínico sendo de extrema relevância a sua capacidade de eliminar BCSC (tumorigénicas) e não-BCSC (constituintes do volume tumoral) (MARCATO *et al.*, 2009).

Parvovírus

Parvovírus H-1 (H-IPV), da família *Parvoviridae*, é um vírus nú de cápside icosaédrica, genoma DNA de cadeia simples (ssDNA), que apresenta como hospedeiro natural roedores. Não sendo um vírus humano, não existe imunidade antiviral pré-existente, o que confere uma vantagem para a OVT (MARCHINI *et al.*, 2015).

A seletividade que este vírus apresenta para as células tumorais está relacionada com o facto do seu ciclo viral ser extremamente dependente de fatores celulares associados a processos de replicação e transcrição, que se encontram desregulados nas células cancerígenas (MARCHINI *et al.*, 2015).

O vírus H-IPV, apesar de conseguir entrar tanto em células normais como cancerígenas, nas primeiras demonstra apenas uma infeção abortiva, sem capacidade de se replicar, enquanto nas células tumorais ocorre um ciclo viral completo, levando à libertação de viriões aquando da oncólise (MARCHINI *et al.*, 2015) (MUHARRAM *et al.*, 2010).

MUHARRAM e a sua equipa (2010) pretenderam estudar a capacidade do H-IPV para destruir células do cancro da mama. Com a realização de um estudo *in vitro*, demonstraram que as células do cancro da mama com elevada taxa mitótica, e em particular as menos diferenciadas eram as mais sensíveis à infeção viral (MUHARRAM *et al.*, 2010).

3.2 Vírus Geneticamente Modificados

3.2.1 Otimização da segurança e seletividade tumoral

De forma a otimizar a seletividade tumoral e minimizar os efeitos *off-target*, muitos vírus são sujeitos a alterações genéticas. Das mais efetuadas no âmbito do cancro da mama, destacam-se:

- Eliminação de genes virais necessários à replicação em células saudáveis, mas dispensáveis nas células cancerígenas;
- Manipulação da superfície viral de forma a redirecionar o *uptake* viral nas células tumorais;
- *Linking* de promotores específicos tumorais a genes virais essenciais (HARTKOPF *et al.*, 2011).

Surgiu recentemente uma outra estratégia para otimizar o oncotropismo dos OV: a aplicação de microRNA. Os microRNA são pequenas sequências endógenas de RNA que não codificam proteínas. Capazes de se ligar a sequências génicas complementares presentes no mRNA alvo, promovem a inibição da sua tradução ou até mesmo degradação do próprio mRNA, controlando assim a regulação génica a um nível pós-transcricional. Desta forma, os microRNA desempenham um papel crucial na regulação do ciclo celular, proliferação, diferenciação, resposta ao stress e apoptose. Assim, tem sido sugerido o seu papel na génese e progressão tumoral. MicroRNA-145 é um microRNA que atua como um supressor tumoral, que se encontra subexpresso nas células cancerígenas da mama, e sobre expresso nas células normais. A sua aplicação na otimização do tropismo viral consiste em incorporar no genoma viral, pequenas sequências específicas de ligação, complementares ao microRNA celular, de maneira a que a replicação viral ocorra sob o seu controlo (SHAYESTEHPOUR *et al.*, 2017) (YE, SHEN e ZHOU, 2019).

Adenovírus

Pertencente à família *Adenoviridae*, Adenovírus (Ad) é um vírus nú, de cápside icosaédrica e genoma DNA de cadeia dupla (dsDNA) que se caracteriza por não integrar o genoma da célula hospedeira, permanecendo no estado episomal. É um vírus endémico entre a população humana e a sua patogenicidade natural está associada a sintomas respiratórios ligeiros. O tropismo deste vírus é parcialmente ditado por um conjunto de proteínas, que revestem a cápside viral, e pelas proteínas fibra que se destacam dos vértices da cápside. Os domínios *knob*, que constituem o ápice globular das proteínas fibra, são o ponto de reconhecimento e ligação ao recetor da célula hospedeira. Os Ad humanos são os OV mais estudados no cancro da mama (ALEMANY, 2014; BRYAN e MATHIS, 2018; EVERTS e POEL, 2005; RIBACKA e HEMMINKI, 2008).

Em 2007 ERIKSSON *et al.* utilizaram três adenovírus modificados, tanto por deleção de genes como por manipulação da superfície viral: Ad5/3- δ 24, Ad5.pk7- δ 24 e Ad5- δ 24RGD. O objetivo do estudo foi demonstrar que estes vírus modificados conseguem atingir de forma seletiva as BCSC. Uma alteração transversal aos três vírus é a deleção do gene δ 24, que consiste na eliminação de 24 pares de bases no gene viral E1A (*Early region 1A*). Esta alteração no genoma viral vai comprometer a formação de proteínas virais (ou não se formam ou são mutantes) não ocorrendo a ligação a uma proteína celular, pRb (pRb – Proteína Retinoblastoma), essencial para a replicação viral nas células normais. As células tumorais, apresentam defeitos na via de sinalização da pRb que tornam a ligação proteica anterior desnecessária, ocorrendo assim a replicação viral. A segurança da utilização destes OV é

assim estabelecida ao ter a sua replicação comprometida nas células normais, e intacta nas tumorais. Os vírus estudados apresentam ainda alterações na cápside. **Ad5/3- δ 24**, é um Ad do serótipo 5 (**Ad5**) que apresenta o domínio *knob* de um Ad do serótipo 3 (**Ad5/3**), o que vai fazer com que este vírus entre na célula hospedeira através do recetor celular para o Ad serótipo 3, altamente expresso em células tumorais. No **Ad5.pk7- δ 24**, foi adicionada uma sequência de polilisina, no terminal C das proteínas fibra do Ad do serótipo 5, fazendo com que o vírus final entre nas células cancerígenas via *heparan sulfate proteoglycans*, que se têm demonstrado altamente expressos no cancro da mama avançado. Por último foi utilizado o **Ad5- δ 24RGD**, em que foi adicionado uma sequência tripeptídica RGD (Arg-Gly-Asp) ao domínio *knob* da proteína fibra de um Ad serótipo 5, permitindo que o vírus ligue a integrinas sobre expressas nas células cancerígenas. Os vírus Ad5/3- δ 24 e Ad5.pk7- δ 24, demonstraram ser os agentes mais promissores. Ambos foram eficazes na destruição das BCSC CD44⁺CD24^{-low} *in vitro* e ainda *in vivo* em murganhos, comprometendo o crescimento de tumores derivados destas células. Contudo, não foi observada uma erradicação completa do tumor (ERIKSSON *et al.*, 2007) (RIBACKA e HEMMINKI, 2008) (RANKI *et al.*, 2007).

No sentido de avaliar os promotores específicos ativos para a oncólise das BCSC, BAUERSCHMITZ e a sua equipa (2008) desenvolveram Ads oncolíticos com promotores *tumor specific* (TSP – Tissue Specific Promoters) no seu genoma assim como a deleção do gene δ 24 e alterações ao nível da cápside (Ad5/3) para otimização da infeção e replicação viral nas BCSC. Foi observado que os promotores *mdr* (*multidrug resistance protein*), hTERT (telomerase) e Cox-2 (ciclo-oxigenase 2) apresentaram atividade nas BCSC, sendo específicos para estas células. Assim avaliou-se a utilidade de cada vírus construído, na destruição das células tumorais CD44⁺CD24^{-low} *in vitro* e *in vivo*. Os vírus Ad5/3-cox2L- δ 24 e Ad5/3-mdr- δ 24 demonstraram ser os mais ativos, capazes de erradicar na totalidade as células CD44⁺CD24^{-low} *in vitro*. *In vivo*, após administração IT, demonstraram no modelo animal uma atividade antitumoral significativa nos tumores derivados das células CD44⁺CD24^{-low}. Contudo, neste estudo também não foi observada uma total eliminação do tumor (BAUERSCHMITZ *et al.*, 2008).

Utilizando a estratégia com microRNA, SHAYESTEHPUR *et al.* (2017) construíram um Ad tumor-seletivo, ao inserirem dez sequências de ligação do microRNA-145 a jusante (*downstream*) do gene viral E1A. Esta equipa realizou o estudo com o objetivo de avaliar a replicação desta nova construção viral em linhas celulares normais e cancerígenas, da mama. A supressão da replicação viral foi observada nas linhas celulares saudáveis da mama, que se pode compreender pelo facto do microRNA-145 estar sobre expresso nestas células normais.

Ao ter mais sequências onde se ligar vai ter o seu papel exacerbado, resultando então na degradação deste mRNA ou inibição da sua tradução, culminando na diminuição significativa da expressão do gene E1A, essencial à replicação viral. Esta equipa conseguiu ainda inferir que quanto maior o número de sequências de ligação ao microRNA inseridas no genoma adenoviral, maior a seletividade da replicação viral nas células cancerígenas. A diferença no nível de expressão do microRNA-145 entre as células normais e cancerígenas da mama, demonstrou ser uma potencial forma de direcionar seletivamente os OV às células do cancro da mama. No entanto são necessários mais estudos para comprovar a mesma seletividade *in vivo* (SHAYESTEHPOUR *et al.*, 2017).

Herpes Simplex Vírus

O Herpes Simplex Vírus-I (HSV-I), pertencente à família *Herpesviridae*, foi o primeiro herpesvírus a ser descoberto. Acolado a este carácter pioneiro na ciência, foi ainda o primeiro vírus oncolítico a receber aprovação regulamentar pela FDA e, mais tarde, pela EMA. De dimensões consideráveis, é um vírus envelopado, de cápside icosaédrica e genoma DNA de dupla cadeia (dsDNA). Um vírus neurotrópico que não integra o genoma da célula hospedeira, permanecendo no estado epissomal. Depois do Ad, HSV-I é dos vírus mais estudados na OVT (EISSA IR, NAOE Y *et al.*, 2017) (EVERTS e POEL, 2005).

WANG *et al.* (2012) avaliaram a atividade do HSV-I em metástases pulmonares do cancro da mama. O vírus estudado, G47 δ , apresenta três mutações específicas no seu genoma: deleção das duas cópias do gene γ 34.5, inativação do gene UL39 e deleção do gene α 47 (WANG *et al.*, 2012).

A função do γ 34.5, determinante da neurovirulência, é bloquear os mecanismos de defesa antiviral da célula hospedeira (como a atividade da PKR), permitindo assim a síntese proteica e replicação viral. Um HSV sem este gene é sujeito ao mecanismo de defesa antiviral celular, que vai impedir que a síntese proteica viral ocorra. Contudo, as células cancerígenas apresentam defeitos nos mecanismos de defesa antiviral, possibilitando que este vírus mutado, incapaz de se replicar em células saudáveis, se replique nas células neoplásicas. Há desta forma uma garantia da segurança da sua aplicação (WANG *et al.*, 2012) (FAN *et al.*, 2016) (NGUYEN, GUZ-MONTGOMERY e SAHA, 2020).

O gene UL39 codifica para a subunidade maior (ICP6) da enzima Ribonucleotídeo Redutase (RR), enzima essencial para a síntese do DNA viral. A inativação deste gene compromete a formação da RR que, estando ausente, impossibilita a replicação viral nas células hospedeiras. Contudo, as células cancerígenas sintetizam elevadas quantidades da enzima RR, o que vai compensar a mutação do genoma viral. Assim, o vírus mutado vai apenas replicar-se

em células cancerígenas, tornando-se seguro em tecido saudável (WANG *et al.*, 2012) (FAN *et al.*, 2016) (NGUYEN, GUZ-MONTGOMERY e SAHA, 2020).

O gene $\alpha 47$ está associado à *downregulation* da apresentação antigénica. A sua deleção leva à elevação da resposta imune antitumoral, graças ao aumento da apresentação antigénica às células T. Com a eliminação do gene $\alpha 47$, a região promotora do gene US11 também é eliminada, ficando este gene, US11, sob o controlo do promotor *immediate-early* do gene $\alpha 47$. Desta forma dá-se a *upregulation* do gene US11 que vai ligar à PKR (enzima envolvida em mecanismos de defesa antiviral) bloqueando a sua atividade de inibir a síntese proteica, e replicação viral, possibilitando a replicação viral nas células malignas (WANG *et al.*, 2012) (NGUYEN, GUZ-MONTGOMERY e SAHA, 2020) (ZENG *et al.*, 2013a) (Figura 2).

O estudo realizado por WANG e a sua equipa (2012) teve como objetivo avaliar a citotoxicidade do G47 δ em linhas celulares e a eficácia da administração sistémica num modelo animal de metástases pulmonares do cancro da mama. Este estudo concluiu que o HSV-1 G47 δ é eficaz contra as células do cancro da mama, atingindo seletivamente as células neoplásicas sem comprometer as células normais. A administração sistémica controlou com sucesso a metastização pulmonar ao inibir o crescimento das lesões metastáticas pulmonares já estabelecidas (WANG *et al.*, 2012).

Outro estudo (2012) teve como objetivo avaliar a eficácia do mesmo vírus G47 δ na destruição de células BCSC. G47 δ demonstrou-se eficaz *in vitro* com a destruição de células BCSC e *in vivo*, com a destruição tumoral no modelo animal após administração IT (LI *et al.*, 2012).

Pouco tempo depois ZENG e a sua equipa (2013a) demonstraram que este vírus (G47 δ) é capaz de infetar tanto células BCSC como não-BCSC, colhidas de diferentes subtipos do cancro da mama. G47 δ ainda comprometeu a capacidade de autorrenovação, tão característica das BCSC. Esta capacidade de HSV-1 se direcionar às BCSC de forma tão eficaz foi um contributo importante que apoia a possibilidade de uma transposição positiva para a clínica (ZENG *et al.*, 2013a).

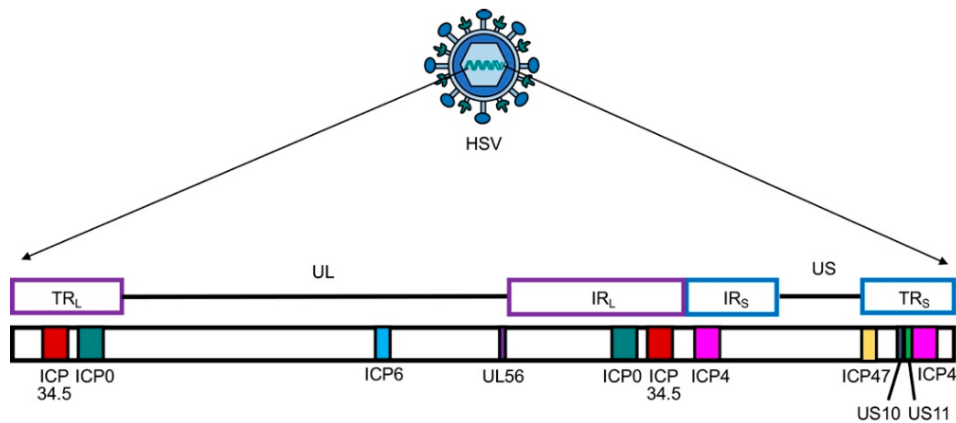


Figura 2. Representação esquemática do genoma viral do HSV com uma seleção de genes identificados. Cadeias únicas longas (UL) e curtas (US) encontram-se representadas, assim como as regiões de repetição internas e terminais (IR e TR) que as delimitam. G47 δ apresenta deleção dos genes γ 34.5, inativação do gene UL39 (ICP6) e deleção do gene α 47 com *upregulation* do gene US11 (NGUYEN, GUZ-MONTGOMERY e SAHA, 2020).

Vírus Vaccinia

O vírus Vaccinia (VV), é um vírus envelopado, e genoma DNA de dupla cadeia (dsDNA), pertencente à família *Poxviridae*. O seu ciclo de vida ocorre no citoplasma, e não no núcleo da célula hospedeira como nos vírus anteriores. VV tem a capacidade de replicar em condições hipóxicas, ambiente em que muitas terapias se tornam resistentes, o que o torna num promissor agente antineoplásico. A curta duração do seu ciclo de vida (cerca de 8h) parece constituir mais uma vantagem, ao ser capaz de se replicar e destruir células com o seu tempo de exposição ao sistema imunitário, minimizado (HOWELLS A, MARELLI G e Y, 2017).

ZHANG e a sua equipa (2007) desenvolveram um VV da estirpe *Lister*, geneticamente modificado, GLV-Ih68. Foram feitas alterações que o tornaram tanto num agente terapêutico, contribuindo para atenuação viral, como de diagnóstico, através de técnicas de imagiologia. Houve a inserção de genes marcadores que codificam para a proteína de fusão verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein – GFP*), β -galactosidase e β -glucuronidase nos genes virais F14.5L, J2R (codifica a timidina cinase) e A56R (codifica a hemaglutinina) respetivamente, inativando-os. Enquanto esta inserção tripla reduziu significativamente a replicação do VV nas células normais, a replicação do vírus nas células tumorais não ficou comprometida no estudo com linhas celulares de cancro da mama humano. Administração por via IV no modelo animal com xenoenxertos de tumores humanos da mama, demonstrou uma colonização preferencial nos tumores sem comprometer outros órgãos, levando à regressão tumoral (ZHANG *et al.*, 2007).

WANG (2012) demonstrou que este mesmo vírus, GLV-Ih68, infetou de forma eficaz as células BCSC, com o fenótipo CD44⁺CD24^{-low} e ALDH⁺. Quando avaliado num modelo

animal xenoenxertado com BCSC, GLV-1h68 foi capaz de inibir o crescimento do próprio tumor, fazendo deste VV um potencial OV para atingir populações como as BCSC, resistentes às terapias convencionais (WANG *et al.*, 2012).

3.2.2 Otimização da Eficácia

Além das estratégias que otimizam a segurança e seletividade dos OV, há ainda a possibilidade de reforçar a eficácia. Os OV podem ser usados como veículos de transgenes terapêuticos para as células cancerígenas, reforçando a sua atividade antineoplásica.

LIIKANEN e a sua equipa de investigadores (2016) desenvolveram um Ad com infetividade intensificada, Ad5/3- δ 24-tras, com informação codificante para os genes das cadeias pesadas e leves do anticorpo monoclonal humanizado Trastuzumab. Esta abordagem revelou-se atrativa ao combinar a imunoterapia oncolítica com produção local de Trastuzumab, resultando numa potente citotoxicidade *in vitro* e uma eficácia antitumoral reforçada *in vivo* (com inibição do crescimento tumoral, redução tumoral e indução de resposta imune antitumoral), no cancro da mama ERBB2⁺, quando comparado com a terapia com Ad ou Trastuzumab isolados. Foi observado ainda uma elevada concentração *tumor-to-systemic* do anticorpo, após injeção IT do OV, quando comparado com a administração sistémica convencional do Trastuzumab (LIIKANEN *et al.*, 2016).

Recentemente foi estudado o vírus G47 δ -mIL12. Um vírus HSV-1 geneticamente modificado, com as mesmas alterações génicas que o vírus G47 δ mencionado atrás, mas que expressa ainda a interleucina 12 (IL-12), resultando na libertação de uma quantidade significativa de IL-12 aquando da infeção das células cancerígenas. IL-12 é um regulador mestre na imunidade antitumoral que reforça a ativação das DC e linfócitos T, induz a produção do IFN γ e inibe a angiogénese. O estudo avaliou a eficácia terapêutica do G47 δ -mIL12 *in vitro*, em linhas celulares animais e humanas, e *in vivo* num modelo tumoral animal, equivalente a um cancro da mama humano no estágio IV. O vírus infetou e eliminou de forma eficiente células TNBC *in vitro*. *In vivo*, a administração IT do G47 δ -mIL12 inibiu o crescimento tumoral no modelo animal e preveniu a formação de metástases nos pulmões graças à ativação intensificada das APC, elevada infiltração intratumoral das células T CD8⁺ e inibição da angiogénese. Este estudo permitiu estabelecer o vírus G47 δ -mIL12 como um poderoso agente imunoterapêutico oncolítico, com ação local e sistémica, no subtipo do cancro da mama com pior prognóstico e menos recursos terapêuticos disponíveis, TNBC (GHOUSE *et al.*, 2020).

Um VV oncolítico, GLV-1h164 construído para expressar o anticorpo de cadeia simples GLAF-2 contra o fator VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), foi testado no cancro

da mama com maior expressão deste fator, o TNBC (2014). GLV-1h164 demonstrou eficácia terapêutica *in vitro* e regrediu de forma significativa xenoinxertos de tumores TNBC em murghanos, após administração IT, *in vivo*. Demonstrou-se ainda que VEGF foi atingido com sucesso, comprovado pela diminuição do fluxo vascular e inibição da vasculatura tumoral pós-tratamento (GHOLAMI *et al.*, 2014).

3.3 Monoterapia na aplicação clínica

Os OV's têm demonstrado uma eficácia terapêutica promissora nos vários estudos pré-clínicos mencionados. Vários são aqueles que têm sido introduzidos em ambiente clínico de forma a comprovar a sua segurança e eficácia, na expectativa de transposição dos mesmos resultados promissores para a clínica. A Tabela I apresenta um resumo sucinto dos OV em monoterapia no cancro da mama, estudados na clínica.

Reovírus

Um ensaio clínico de fase I (2010) teve como objetivo principal avaliar a segurança e tolerância de um oReo em doentes com tumores em estado avançado ou metastático. O OV em estudo foi Reolysin® – um oReo de estirpe *Dearing* (serótipo 3) produzido pela *Oncolytics Biotech* no Canadá. O estudo incluiu 18 doentes, 2 com cancro da mama. Após administração IV, Reolysin® demonstrou-se seguro e bem tolerado tendo ainda a sua eficácia sido objeto de análise. Dos doentes em estudo, 1 indivíduo com cancro da mama metastático, apresentou uma resposta parcial (redução em 34% do volume tumoral), 7 outros doentes com outro tipo de cancro manifestaram-se estáveis, e os restantes sofreram progressão tumoral. Reportou-se assim um benefício clínico global de 45%, pouco representativo para o cancro da mama (GOLLAMUDI *et al.*, 2010).

Em 2013, uma outra equipa desenvolveu um outro estudo de fase I com Reolysin® em monoterapia, em 19 doentes com tumores sólidos em estado avançado ou metastático, 3 dos quais com cancro da mama metastático. Desta vez a administração foi realizada por via IT (injeção percutânea em tumores palpáveis). Foi reportada alguma eficácia no local de injeção tendo 7 dos 19 doentes apresentado benefícios clínicos: 1 com resposta completa ao tratamento, 2 com resposta parcial e 4 estabilizados (1 dos quais com cancro da mama). Apesar da eficácia terapêutica localizada, não foi observada atividade antitumoral relevante ao nível das lesões distantes do local de injeção. Contudo, Reolysin® provou-se seguro e bem tolerado entre os participantes (MORRIS *et al.*, 2013).

Adenovírus

Um ensaio clínico utilizou um Ad oncolítico com quatro alterações no seu genoma: Ad5/3-E2F-624-GMCSF. Além de incluir algumas alterações já estudadas em meio pré-clínico, foi ainda inserido um gene promotor específico tumoral, E2F1, no genoma viral assim como o gene GMCSF (*Granulocyte macrophage-colony stimulating factor*), potente indutor da imunidade sistêmica antitumoral (associado ao recrutamento e maturação das APC, células dendríticas na sua maioria, e ao recrutamento de células da imunidade inata como as células NK e neutrófilos). O Ad foi administrado por via IV e depois IT em 13 doentes com tumores metastáticos e refratários, 3 dos quais com cancro da mama. O vírus pareceu ser seguro com registo de atividade antitumoral. No entanto, ensaios clínicos com demonstração destes aspetos em populações mais homogêneas seriam necessários para obter resultados mais representativos e objetivos (HEMMINKI *et al.*, 2015).

Herpes Simplex Vírus

Em 2012, o vírus HSV-1 HF10, uma estirpe viral naturalmente mutada, foi avaliada em 6 doentes com cancro da mama recorrente. Neste estudo o HSV-1 foi administrado por via IT nos nódulos tumorais. Os doentes demonstraram redução do tamanho tumoral e ainda infiltração de células T CD8⁺ citotóxicas, sugestivas de uma resposta imune antitumoral (SAHIN *et al.*, 2012).

Recentemente, KASUYA *et al.*, (2014) desenvolveram um estudo clínico de fase I, com o mesmo vírus e via de administração (HSV-1 e IT) em 17 doentes com tumores superficiais refratários, 6 dos quais com cancro da mama metastático. As injeções com HF10 demonstraram-se seguras e bem toleradas, tendo sido ainda registado algum potencial terapêutico (KASUYA *et al.*, 2014).

Vírus Vaccinia

Um vírus vaccinia geneticamente modificado pertencente à estirpe *Western* (vvDD-CDSR), muito virulenta em modelos animais, foi desenvolvido de forma a reforçar a sua seletividade tumoral, com a eliminação de dois genes essenciais à replicação viral em células normais: Timidina Cinase e Fator de Crescimento Vaccinia. Este vírus foi testado num ensaio clínico de fase I, administrado via IT em 16 doentes com tumores sólidos, 4 dos quais com cancro da mama. vvDD-CDSR demonstrou-se seguro, com elevada seletividade tumoral na sua replicação, chegando a atingir algumas células tumorais afastadas do local de injeção, e com poucos efeitos adversos graves. Entre os 4 doentes com cancro da mama foi observado um caso em que a terapia não foi capaz de atingir as metástases distantes do local de injeção.

Apesar das evidências de atividade antitumoral existente, esta demonstrou-se limitada e pouco relevante (ZEH *et al.*, 2015).

Membros da mesma equipa desenvolveram um outro estudo com o mesmo vírus, wvDD-CDSR, mas usando uma estratégia diferente (2016). Neste estudo, o vírus em causa foi administrado por via IV em 11 doentes com cancro avançado metastático. Uma estratégia promissora, dado a natureza disseminativa da doença e as próprias limitações da administração IT no alcance de metástases distantes, como demonstrado no estudo anterior. Não obstante este estudo não ter incluído doentes com cancro da mama, foi comprovada a segurança e infetividade desta terapia, assim como a atividade antitumoral que apesar de demonstrada, se revelou limitada. O estudo revelou-se pequeno demais para se poder correlacionar o genoma viral circulante com a resposta tumoral (DOWNS-CANNER *et al.*, 2016).

Tabela 1: Quadro resumo da seleção de estudos clínicos com OV's em monoterapia

Vírus	OV	Via	População	Conclusões	
Reovírus	Reolysin® Serótipo 3 Estirpe <i>Dearing</i>	IV	18 doentes com cancro avançado ou metastático (2 com cancro da mama).	Seguro e bem tolerado. Atividade antitumoral registada.	(GOLLAMUDI <i>et al.</i> , 2010)
		IT	19 doentes com cancro em estado avançado ou metastático (3 com cancro da mama).	Seguro e bem tolerado. Atividade antitumoral registada, mas limitada.	(MORRIS <i>et al.</i> , 2013)
Adenovírus	Ad5/3-E2F- δ 24-GMCSF	IV/IT	13 doentes com tumores metastáticos refratários às terapias convencionais (3 com cancro da mama).	Seguro e bem tolerado. Atividade antitumoral registada.	(HEMMINKI <i>et al.</i> , 2015)
Herpes Simplex Vírus	HF10 Mutante espontâneo do HSV-1	IT	6 doentes com cancro da mama recorrente.	Seguro e bem tolerado. Atividade antitumoral registada.	(SAHIN <i>et al.</i> , 2012)
			17 doentes com tumores superficiais refratários às terapias convencionais (3 com cancro da mama).		(KASUYA <i>et al.</i> , 2014)
Vaccinia Vírus	VvDD-CDSR Estirpe <i>Western</i>	IT	16 doentes com tumores sólidos em estado avançado (4 com cancro da mama).	Seguro e bem tolerado. Atividade antitumoral registada, mas limitada.	(ZEH <i>et al.</i> , 2015)
		IV	11 doentes com tumores metastáticos refratários às terapias convencionais (Sem doentes com cancro da mama).	Seguro. Atividade antitumoral registada, mas limitada.	(DOWNS-CANNER <i>et al.</i> , 2016)

3.4 Terapia combinada

Graças às estratégias de construção de OV's, implementadas com o intuito de otimizar eficácia e garantir a segurança, a OVT em monoterapia tem apresentado resultados promissores. Contudo, mostram-se um tanto modestos, interferindo com a obtenção de resultados objetivos. Perante este cenário têm sido estudadas terapêuticas combinadas, juntando OV's a algumas terapias antineoplásicas. Tendo em conta que determinadas

combinações fazem mais sentido por atuarem de forma sinérgica, têm sido propostas as seguintes estratégias terapêuticas (OTTOLINO-PERRY *et al.*, 2010).

3.4.1 Vírus Oncolíticos e Immune Checkpoint Inhibitors

A destruição de células cancerígenas pelo sistema imune representa um componente crucial na OVT. Esta destruição ocorre em parte graças às proteínas ‘*checkpoint*’, (CTLA-4 e PD-1), na superfície das células do sistema imune como as células T CD8⁺ citotóxicas, que possibilitam o ataque às células neoplásicas, não afetando as saudáveis. Contudo, muitos tumores desenvolvem mecanismos de defesa contra esta atividade antitumoral, através da sobre expressão de *immune checkpoint regulators* CD80/CD86 e PD-L1 que ligam respetivamente a CTLA-4 e PD-1 nas células T, conduzindo à inibição da sua atividade antineoplásica. Este “escape” das células neoplásicas ao sistema imune pode, teoricamente, ser contornado através da aplicação de inibidores das proteínas *checkpoint* (*Immune Checkpoint Inhibitors* – ICI). São anticorpos reativos a proteínas como PD-1, PD-L1 e CTLA-4, impedindo a ligação recetor-ligando e a consequente inativação das células T pelas células malignas. Esta abordagem torna-se dependente do número de células T citotóxicas disponíveis para atingir o tumor. Por sua vez, se a OVT induz o aumento de células T citotóxicas reativas ao tumor, vai reforçar a resposta a esta terapêutica (DINE, 2017) (RUSSELL e BARBER, 2018).

Recentemente, foi demonstrado que cerca de 20% dos doentes com cancro da mama apresentavam sobre expressão de PD-L1, associada a um pior prognóstico. MOSTAFA *et al.* (2018) avaliaram a capacidade dos ICI sistémicos potenciarem a eficácia de um oReo intratumoral no tratamento do cancro da mama. *In vitro*, além de se ter demonstrado os fenómenos de oncólise e produção de citocinas (em linhas tumorais humanas e animais) foi observado ainda que a infeção viral produtiva levou à *upregulation* de PD-L1 nas células tumorais, que revela a necessidade de aplicação dos ICI. *In vivo*, primeiro foi administrado o OV via IT e depois a terapia sistémica anti-PD-1 (ICI). Observou-se uma redução significativa da massa tumoral com uma sobrevivência global dos murganhos em estudo, positiva, sendo que 70% desta população apresentou erradicação tumoral 110 dias após a injeção IT. A terapia combinada levou ainda à geração de uma resposta imune adaptativa antitumoral a nível sistémico. Assim, esta terapia combinada representa uma estratégia terapêutica lógica para o tratamento do cancro da mama e fornece bases para investigação futura em ambiente clínico (MOSTAFA *et al.*, 2018).

3.4.2 Vírus Oncolíticos e Quimioterapia

A quimioterapia, considerada convencional no tratamento antineoplásico, acaba por ser transversal aos vários subtipos do cancro da mama. Apesar das suas desvantagens, vários estudos que avaliam a combinação de quimioterápicos e OVT prometem tirar proveito do melhor das duas terapias. Combinações da OVT com agentes como Paclitaxel ou Doxorubicina têm sido alvo de vários ensaios no âmbito do cancro da mama (PANDHA *et al.*, 2016).

Adenovírus e Paclitaxel

FANG *et al.* (2014) avaliaram a eficácia da combinação de um Ad oncolítico (ZD55 IL-24), com Paclitaxel, em linhas celulares do cancro da mama. O Ad ZD55 IL-24 apresenta uma deleção no gene E1B, determinante para a replicação seletiva nas células cancerígenas, e expressa o gene para a interleucina 24 (IL-24). Esta interleucina apresenta potencial anticancerígeno desde a indução da apoptose das células malignas e da resposta imune antitumoral à inibição do crescimento tumoral, angiogénese e da metastização. Foi demonstrado que o Paclitaxel aumentou significativamente o *uptake* viral sem interferir com a replicação viral nas células cancerígenas, enquanto o Ad ZD55 IL-24 potenciou de forma significativa os efeitos do Paclitaxel na supressão do crescimento celular e na indução da apoptose. Tendo esta combinação demonstrado uma ação citotóxica muito mais eficaz do que cada uma das duas terapias isoladas, torna-se evidente que esta estratégia terapêutica representa uma abordagem promissora na terapia do cancro da mama (FANG *et al.*, 2013).

Herpes Simplex Vírus e Paclitaxel

O estudo da combinação do OV HSV-I G47 δ e Paclitaxel, revelou um efeito antineoplásico sinérgico quer *in vitro* quer *in vivo*, em murganhos. Paclitaxel não influenciou de forma significativa a replicação e distribuição do vírus, mas o vírus demonstrou potenciar a atividade antitumoral do quimioterápico através da indução da paragem mitótica e apoptose. Foi ainda demonstrado *in vivo* que nesta terapia combinada a dose do Paclitaxel pode ser diminuída em 80% e ter o mesmo nível de redução tumoral que a dose original (mais agressiva) em monoterapia. Esta terapia combinada aparenta ser um regime terapêutico seguro e eficaz para o tratamento do cancro da mama (ZENG *et al.*, 2013b).

A mesma equipa demonstrou que HSV-I e Paclitaxel trabalharam sinergicamente na destruição de células BCSC (quimioresistentes) e células cancerígenas não-BCSC, constituintes do volume tumoral (ZENG *et al.*, 2013a).

De acordo com *clinicaltrials.gov*, encontra-se ativo um ensaio clínico de fase I/II com a combinação de um HSV-1 (T-VEC) e Paclitaxel, em indivíduos com cancro da mama TNBC (*Clinical Trial Identifier: NCT02779855*). O estudo tem como objetivo avaliar se T-VEC, administrado por via IT, durante um regime de tratamento com Paclitaxel neoadjuvante, consegue reforçar a eliminação das células cancerígenas deste subtipo de cancro, conhecido pelo seu mau prognóstico. Uma vantagem acrescida à utilização do T-VEC em específico, é o facto de já ser um OV bem reconhecido, aceite por várias agências regulamentares, no tratamento do melanoma. Este facto suscita curiosidade nos investigadores, ao quererem determinar se este vírus consegue alcançar efeitos igualmente benéficos noutros tipos de cancro, como o cancro da mama TNBC.

Reovírus e Paclitaxel

Um ensaio clínico de fase II foi desenvolvido por uma equipa no Canadá, para avaliar a eficácia e segurança de adicionar um Reovírus serótipo 3 e estirpe *Dearing*, Pelareorep (também conhecido por Reolysin[®]) ao Paclitaxel (ambos via IV) em doentes com cancro da mama metastático. Os resultados do estudo que incluiu 84 doentes, permitiram inferir que a combinação contribuiu para o aumento significativo do tempo médio de sobrevida no grupo de 36 doentes que recebeu a combinação (17.4 meses) em comparação com o de 38 doentes que recebeu Paclitaxel isolado (10.4 meses) (BERNSTEIN *et al.*, 2018).

Herpes Simplex Vírus e Doxorrubicina

A Doxorrubicina também se tem revelado promissora quando combinada com a OVT. ZHUANG *et al.* (2012) demonstraram que a administração combinada do vírus oncolítico HSV-1 com Doxorrubicina aumentou a sensibilidade das células BCSC previamente resistentes à quimioterapia. Aumentou ainda de forma sinérgica a resposta antitumoral no modelo animal, *in vivo*, com o tempo médio de sobrevida superior ao obtido com as terapias isoladas (ZHUANG *et al.*, 2012).

Um outro estudo combinou Doxorrubicina com um HSV-2 e demonstrou um aumento dos efeitos antineoplásicos, em comparação com as terapias isoladas, num modelo animal de cancro da mama metastático (ZHAO *et al.*, 2014).

3.4.3 Vírus Oncolíticos e Inibidores das Histona Deacetilases

Os inibidores das enzimas histona deacetilases são outra classe terapêutica antineoplásica, que tem sido estudada no âmbito do cancro na mama em conciliação com a OVT.

As enzimas histona deacetilases (HDAC – *Histone Deacetylase*) comprometem a atividade das histonas e outras proteínas responsáveis pela reparação, replicação e transcrição do DNA, influenciando de forma relevante todos os processos celulares. A desregulação das HDAC tem sido associada à promoção da carcinogênese e progressão tumoral, conferindo assim aos seus inibidores (HDACi – *Histone Deacetylase Inhibitors*) propriedades anticancerígenas. HDACi induzem assim paragem no crescimento, senescência e morte nas células neoplásicas, mas não nas células normais. Esta morte celular é imunogénica, levando à intensificação das respostas imunes antitumorais. Os HDACi demonstraram ainda, inibir angiogénese e enfraquecer a expressão do IFN. Múltiplos grupos têm explorado a possibilidade de combinar OVT com HDACis numa tentativa de suprimir a atividade tumoral residual antiviral e consequentemente melhorar a replicação e distribuição viral (MARCHINI, SCOTT e ROMMELAERE, 2016).

CODY *et al.* (2014) mostraram que a administração de HDACi aumentou a atividade de HSV oncolíticos (com os genes γ 34.5 eliminados do seu genoma) em células cancerígenas do cancro da mama, ao comprometer as respostas inatas antivirais. Aumentou de igual forma a replicação viral nas células tumorais da mama sem, no entanto, o mesmo acontecer nas células saudáveis da mama (CODY, MARKERT e HURST, 2014).

3.4.4 Vírus Oncolíticos, Inibidores da Aromatase, Immune Checkpoint Inhibitors e Trastuzumab

A *Oncolytics Biotech*, como continuação do estudo de fase II que se realizou no Canadá onde demonstrou que a administração conjunta Paclitaxel + Pelareorep provocou um aumento do tempo médio de sobrevivência no cancro da mama metastático, tem estado a desenvolver em Espanha e ainda em fase de recrutamento, um estudo clínico de fase I de acordo com *clinicaltrials.gov* (*Clinical Trial Identifier*: NCT04102618). Este estudo denominado ‘*A Window-of-opportunity Study of Pelareorep in Early Breast Cancer (AWARE-I)*’ tem como principal objetivo avaliar se Pelareorep, em combinação com diferentes terapêuticas antineoplásicas características ao subtipo do cancro da mama, contribui para a redução do crescimento de células malignas com potenciação da resposta imune anticancerígena. Este estudo vai acompanhar o que acontece efetivamente ao tumor durante este tratamento, sendo avaliada ainda a segurança destas mesmas combinações (BERNSTEIN *et al.*, 2018).

O estudo inclui 5 grupos de participantes. O grupo 1 inclui doentes com cancro da mama em fase inicial do subtipo HR⁺/ERBB2⁻ que vão ser sujeitos à terapia com Pelareorep (OV) e Letrozol (AI). O grupo 2 compreende doentes com o mesmo tipo de cancro e terapia, mas com a adição do ICI anti-PD-L1 (Atezolizumab) à estratégia terapêutica. No grupo 3,

estão doentes com o subtipo TNBC, sujeitos à terapia com Pelareorep e Atezolizumab. Os grupos 4 e 5 incluem doentes com cancro da mama HR⁺/ERBB2⁺ e HR⁻/ERBB2⁺ respetivamente, submetidos à terapia com Pelareorep, Trastuzumab (anti-ERBB2) e Atezolizumab. À data de 23 de maio deste ano, o grupo I já foi submetido a tratamento. Através dos resultados obtidos foi permitido concluir que: a administração IV resultou em replicação viral, específica para células cancerígenas; todos os doentes submetidos ao OV revelaram um aumento das células T CD8⁺ e de células expressoras de PD-L1, sugerindo uma sinergia terapêutica para a combinação com ICI (MANSO *et al.*, 2020) (Figura 3).

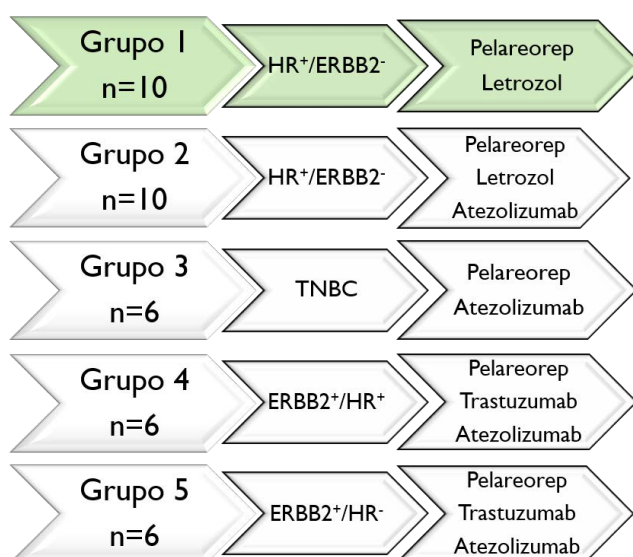


Figura 3. Representação esquemática do ensaio clínico ativo, desenvolvido pela *Oncolytics Biotech* denominado 'A Window-of-opportunity Study of Pelareorep in Early Breast Cancer (AWARE-1)'. O grupo I já se encontra concluído, tendo apresentado resultados positivos (n=n° indivíduos).

3.4.5 Vírus Oncolíticos, Quimioterapia e *Immune Checkpoint Inhibitors*

Segundo *clinicaltrials.gov*, também ainda este ano, teve início o desenvolvimento de um ensaio clínico de fase II com o mesmo reovírus oncolítico, Pelareorep (*Clinical Trial Identifier*: NCT04215146). Neste estudo *Oncolytics Biotech* colabora com a Merck e a Pfizer no desenvolvimento do Pelareorep em combinação com Paclitaxel e o anticorpo anti-PD-L1 Avelumab (ICI), para o tratamento de cancro da mama metastático HR⁺, sendo esta a população alvo do estudo. O objetivo do estudo culmina na expectativa de comprovar o efeito antineoplásico do OV Pelareorep em combinação com o Paclitaxel e Avelumab, assegurando paralelamente a avaliação da segurança desta combinação tripla. O estudo vai incluir 48 indivíduos, divididos em 3 grupos: O primeiro inclui os indivíduos tratados apenas com Paclitaxel; o segundo com Paclitaxel + Pelareorep; e o terceiro com Paclitaxel + Pelareorep +

Avelumab. Este estudo vai assim averiguar se a combinação tripla é mais eficaz que o Paclitaxel isolado ou Paclitaxel + Pelareorep (ONCOLYTICS BIOTECH, 2019).

3.5 Limitações à Viroterapia Oncolítica no Cancro da mama

Via de administração

Ao longo dos vários estudos realizados, pré-clínicos e clínicos, destacam-se duas principais vias de administração, ambas com as suas limitações.

A administração via IV, pelo seu carácter simples e rápido tem sido a preferida para muitos investigadores. O seu carácter pouco invasivo que permite múltiplas administrações torna esta via mais prática em ambiente clínico. Trata-se de uma abordagem aparentemente promissora ao permitir uma ampla distribuição viral culminando na infeção do tumor primário e das suas metástases. Contudo, é uma via mais sujeita ao risco de toxicidade e efeitos *off-target*, sendo crucial a utilização de OV's com elevada seletividade. Este tipo de administração suscetibiliza os OV à neutralização viral por anticorpos pré-existentes, proteínas do complemento e “sequestro” ao nível do fígado e baço. Assim a carga viral que atinge o tumor alvo é menor, culminando numa eficácia terapêutica comprometida. O facto de se aumentar a concentração viral a administrar para compensar a pouca seletividade e carga viral tumoral, suscita alguma preocupação no que toca à segurança desta terapia via IV (ZHENG *et al.*, 2019) (LI *et al.*, 2020) (FILLEY e DEY, 2017).

A administração via IT, a mais comum na OVT, ao permitir que a carga viral administrada seja a mesma que chega às células tumorais alvo tem sido considerada por investigadores como a estratégia que oferece uma eficácia terapêutica mais objetiva. Esta abordagem permite que a concentração de OV no alvo seja monitorizada, prevenindo ainda efeitos *off-target*. Contudo, tem a sua eficácia comprometida ao nível de tumores de difícil acesso e metástases afastadas do tumor primário. A sua complexidade, associada aos riscos e custos, comprometem a sua repetição ao longo dos vários estudos (SURYAWANSHI, ZHANG e ESSANI, 2017) (LI *et al.*, 2020) (ZHENG *et al.*, 2019).

Biossegurança

Os OV's são eliminados do organismo através dos fluidos corporais, ocorrendo a libertação de partículas virais. O impacto que esta excreção irá ter ao nível da saúde pública, principalmente nos doentes imunodeprimidos, geriátricos e pediátricos, e até mesmo na saúde ambiental deve ser avaliado com extrema cautela. Sendo poucos os estudos que abordam esta vertente, é essencial que, para além de se avaliar a eficácia e segurança nos estudos com OV's,

se assegure a segurança ambiental. Sem uma avaliação completa do risco ambiental, agências regulamentares como a FDA e a EMA dificilmente vão aceitar OVT candidatas, por muito promissoras que se apresentem (SURYAWANSHI, ZHANG e ESSANI, 2017) (BUIJS *et al.*, 2015).

Heterogeneidade da População em estudo

Com base nos vários ensaios feitos ao longo dos anos em que os OV desempenharam o papel principal, quer em contexto pré-clínico como clínico, a avaliação do seu efeito ao nível no cancro da mama neste último cenário tem ficado aquém das expectativas. Grande parte dos estudos clínicos com OV em que o cancro da mama é incluído, integram poucos indivíduos com esta doença. Neste sentido, os OV revelam-se um pobre indicador de vantagem clínica, uma vez que são necessários estudos maiores com populações mais homogêneas para se tornarem fiáveis na avaliação do seu efeito no cancro da mama (EBRAHIMI *et al.*, 2019).

4. Conclusão e Perspetivas Futuras

O cancro da mama é o tipo de cancro mais prevalente entre a população feminina a nível mundial. Perante o insucesso das terapias antineoplásicas disponíveis os OV têm sido intensamente estudados nos mais variados tipos de cancro, apresentando resultados muito promissores no carcinoma da mama. Contudo, algumas limitações associadas, atrasam o seu sucesso na clínica. Não obstante, os resultados que se tem vindo a apresentar e os ensaios clínicos prometidos nos próximos tempos têm vindo a comprovar todo o potencial da OVT no tratamento do cancro da mama, que parece poder ser otimizado quando combinado com outras terapias antineoplásicas. Desta forma, a OVT, apesar das suas limitações, apresenta um enorme potencial para se tornar uma realidade muito em breve.

5. Bibliografia

- AL-HAJJ, M., WICHA, M. S., BENITO-HERNANDEZ, A., MORRISON, S. J., CLARKE, M. F. - **Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 100:7 (2003) 3983–3988.
- ALEMANY, R. - **Oncolytic Adenoviruses in Cancer Treatment.** Biomedicines. 2:1 (2014) 36–49.
- ALI, S., RASOOL, M., CHAUDHRY, H., PUSHPARAJ, P. N., JHA, P., HAFIZ, A., MAHFOOZ, M., SAMI, G. A., KAMAL, M. A., BASHIR, S., ALI, A., JAMAL, M. S. - **Molecular mechanisms and mode of tamoxifen resistance in breast cancer.** Bioinformation. 12:3 (2016) 135–139.
- ARAB, A., BEHRAVAN, N., RAZAZN, A., BARATI, N., MOSAFFA, F., NICASTRO, J., SLAVCEV, R., BEHRAVAN, J. - **The viral approach to breast cancer immunotherapy.** Journal of Cellular Physiology. 234:2 (2019) 1257–1267.
- BAI, X., NI, J., BERETOV, J., GRAHAM, P., LI, Y. - **Cancer stem cell in breast cancer therapeutic resistance.** Cancer Treatment Reviews. 69 (2018) 152–163.
- BAUERSCHMITZ, G. J., RANKI, T., KANGASNIEMI, L., RIBACKA, C., ERIKSSON, M., PORTEN, M., HERRMANN, I., RISTIMAKI, A., VIRKKUNEN, P., TARKKANEN, M., HAKKARAINEN, T., KANERVA, A., REIN, D., PESONEN, S., HEMMINKI, A. - **Tissue-Specific Promoters Active in CD44+ CD24 -/ low Breast Cancer Cells.** Cancer Research. 68:14 (2008) 5533–5539.
- BERNSTEIN, V., ELLARD, S. L., DENT, S. F., TU, D., MATES, M., DHESY-THIND, S. K., PANASCI, L., GELMON, K. A., SALIM, M., SONG, X., CLEMONS, M., KSIENSKI, D., VERMA, S., SIMMONS, C., LUI, H., CHI, K., FEILOTTER, H., HAGERMAN, L. J., SEYMOUR, L. - **A randomized phase II study of weekly paclitaxel with or without pelareorep in patients with metastatic breast cancer: final analysis of Canadian Cancer Trials Group IND.213.** Breast Cancer Research and Treatment. 167:2 (2018) 485–493.
- BRYAN, S. M. O., MATHIS, J. M. - **Oncolytic Virotherapy for Breast Cancer Treatment.** Current Gene Therapy. 18:4 (2018) 192–205.
- BUIJS, P. RA., VERHAGEN, J. HE., VAN EIJCK, C. HJ., VAN DEN HOOGEN, B. G. - **Oncolytic viruses: From bench to bedside with a focus on safety.** Human Vaccines and Immunotherapeutics. 11:7 (2015) 1573–1584.

CARDOSO, F., KYRIAKIDES, S., OHNO, S., PENAULT-LLORCA, F., POORTMANS, P., RUBIO, I. T., ZACKRISSON, S., SENKUS, E. - **Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.** *Annals of Oncology.* 30:8 (2019) 1194–1220.

COCKLE, J. V., SCOTT, K. J. - **What is oncolytic virotherapy?** *Archives of Disease in Childhood.* 103:1 (2017) 43–45.

CODY, J. J., MARKERT, J. M., HURST, D. R. - **Histone deacetylase inhibitors improve the replication of oncolytic herpes simplex virus in breast cancer cells.** *PLoS ONE.* 9:3 (2014) 1–7.

CONLEY, S. J., GHEORDUNESCU, E., KAKARALA, P., NEWMAN, B., KORKAYA, H., HEATH, A. N., CLOUTHIER, S. G., WICHA, M. S. - **Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 109:8 (2012) 2784–2789.

DAVOLA, M. E., MOSSMAN, K. L. - **Oncolytic viruses: how “lytic” must they be for therapeutic efficacy?** *Oncolimmunology.* 8:6 (2019) e1581528.

DAWOOD, S., AUSTIN, L., CRISTOFANILLI, M. - **Cancer stem cells: implications for cancer therapy.** *Oncology.* 28:12 (2014) 1101-7, 1110.

DE ANGELIS, M. L., FRANCESCANGELI, F., ZEUNER, A. - **Breast cancer stem cells as drivers of tumor chemoresistance, dormancy and relapse: New challenges and therapeutic opportunities.** *Cancers.* 11:10 (2019).

DEY, P., RATHOD, M., DE, A. - **Targeting stem cells in the realm of drug-resistant breast cancer.** *Targets and Therapy.* 11 (2019) 115–135.

DIMMOCK, N. J., EASTON, A. J., LEPPARD, K. N. - **Virus growth in cells.** In: DIMMOCK, N. J., EASTON, A. J., LEPPARD, K. N. - *Introduction to Modern Virology*, UK: John Wiley & Sons. 2016, ISBN: 978-1-119-97810-7. 61–62.

DINE, J. - **Immune Checkpoint Inhibitors: An Innovation in Immunotherapy.** *Asia Pac J Oncol Nurs.* 4:2 (2017) 95–7.

DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE. Programa nacional para as doenças oncológicas 2017. Lisboa: DGS, 2017.

DOWNS-CANNER, S., GUO, Z. S., RAVINDRANATHAN, R., BREITBACH, C. J., O'MALLEY, M. E., JONES, H. L., MOON, A., MCCART, J. A., SHUAI, Y., ZEH, H. J., BARTLETT, D. D. - **Phase I Study of Intravenous Oncolytic Poxvirus (vDD) in**

Patients with Advanced Solid Cancers. *Molecular Therapy.* 24:8 (2016) 1492–1501.

EBRAHIMI, S., GHORBANI, E., SHAFIEE, M., RYZHIKOV, M., HASSANIAN, S. M., AZADMANESH, K. - **Therapeutic potency of oncolytic virotherapy in breast cancer targeting, current status and perspective.** *Journal of Cellular Biochemistry.* 120:3 (2019) 2801–2809.

EISSA, I. R., NAOE, Y., BUSTOS-VILLALOBOS, I., ICHINOSE, T., TANAKA, M., ZHIWEN, W., MUKOYAMA, N., MORIMOTO, T., MIYAJIMA, N., HITOKI, H., SUMIGAMA, S., ALEKSIC, B., KODERA, Y., AND KASUYA, H. - **Genomic Signature of the Natural Oncolytic Herpes Simplex virus HF10 and its Therapeutic Role in Preclinical and Clinical Trials.** *Frontiers in Oncology.* 7:149 (2017).

ERIKSSON, M., GUSE, K., BAUERSCHMITZ, G., VIRKKUNEN, P., TARKKANEN, M., TANNER, M., HAKKARAINEN, T., KANERVA, A., DESMOND, R. A., PESONEN, S., HEMMINKI, A. - **Oncolytic Adenoviruses Kill Breast Cancer Initiating CD44+CD24-/Low Cells.** *Molecular Therapy.* 15:12 (2007) 2088–2093.

EVERTS, B., VAN DER POEL, H. G. - **Replication-selective oncolytic viruses in the treatment of cancer.** *Cancer Gene Therapy.* 12:2 (2005) 141–161.

EYLER, C. E., RICH, J. N. - **Survival of the Fittest Cancer Stem Cells in Therapeutic.** *Journal of Clinical Oncology.* 26:17 (2009) 2839–2845.

FAN, J., JIANG, H., CHENG, L., LIU, R. - **The oncolytic herpes simplex virus vector, G47Δ, effectively targets tamoxifen-resistant breast cancer cells.** *Oncology Reports.* 35:3 (2016) 1741–1749.

FANG, L., CHENG, Q., BAI, J., QI, Y-D., LIU, J-J., LI, L-T., ZHENG, J-N. - **An oncolytic adenovirus expressing interleukin-24 enhances antitumor activities in combination with paclitaxel in breast cancer cells.** *Molecular Medicine Reports.* 8:5 (2013) 1416–1424.

FILLEY, A. C., DEY, M. - **Immune system, friend or foe of oncolytic virotherapy?** *Frontiers in Oncology.* 7 (2017) 106.

GHOLAMI, S., MARANO, A., CHEN, N. G., AGUILAR, R. J., FRENTZEN, A., CHEN, C-H., LOU, E., FUJISAWA, S., EVENO, C., BELIN, L., ZANZONICO, P., SZALAY, A., FONG, Y. - **A novel vaccinia virus with dual oncolytic and anti-angiogenic therapeutic effects against triple-negative breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat.* 148:3 (2014) 489–499.

GHOUSE, S. M., NGUYEN, H-M., BOMMAREDDY, P. K., GUZ-MONTGOMERY, K., SAHA,

D. - **Oncolytic Herpes Simplex Virus Encoding IL12 Controls Triple-Negative Breast Cancer Growth and Metastasis.** *Frontiers in Oncology*. 10:384 (2020).

GINESTIER, C., HUR, M. H., CHARAFE-JAUFFRET, E., MONVILLE, F., DUTCHER, J., BROWN, M., JACQUEMIER, J., VIENS, P., KLEER, C., LIU, S., SCHOTT, A., HAYES, D., BIRNBAUM, D., WICHA, M. S., DONTU, G.. - **ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome.** *Cell Stem Cell*. 1:5 (2007) 555–567.

GOLLAMUDI, R., GHALIB, M. H., DESAI, K. K., CHAUDHARY, I., WONG, B., EINSTEIN, M., COFFEY, M., GILL, G. M., METTINGER, K., MARIADASON, J. M., MANI, S., GOEL, S. - **Intravenous administration of Reolysin®, a live replication competent RNA virus is safe in patients with advanced solid tumors.** *Investigational New Drugs*. 28:5 (2010) 641–649.

HARTKOPF, A.D., FEHM, T., WALLWIENER, D., LAUER, U. M. - **Oncolytic virotherapy of breast cancer.** *Gynecologic Oncology*. 123 (2011) 164–171.

HATA, Y., ETOH, T., INOMATA, M., SHIRAISHI, N., NISHIZONO, A., KITANO, S. - **Efficacy of oncolytic reovirus against human breast cancer cells.** *Oncology Reports*. 19:6 (2008) 1395–1398.

HEMMINKI, O., PARVIAINEN, S., JUHILA, J., TURKKI, R., LINDER, N., LUNDIN, J., KANKAINEN, M., RISTIMAKI, A., KOSKI, A., LIIKANEN, I., OKSANEN, M., NETTELBECK, D. M., KAIREMO, K., PARTANEN, K., JOENSUU, T., KANERVA, A., HEMMINKI, A. - **Immunological data from cancer patients treated with Ad5/3-E2F-Δ24-GMCSF suggests utility for tumor immunotherapy.** *Oncotarget*. 6:6 (2015) 4467–4481.

HOWELLS, A., MARELLI, G., LEMOINE, N. R., WANG, Y. - **Oncolytic Viruses — Interaction of Virus and Tumor Cells in the Battle to Eliminate Cancer.** *Frontiers in Oncology*. 7:195 (2017).

KANEDA, Y., SAGA, K. - **Oncolytic Sendai virus-based virotherapy for cancer: recent advances.** *Oncolytic Virotherapy*. 4 (2015) 141–147.

KASUYA, H., KODERA, Y., NAKAO, A., YAMAMURA, K., GEWEN, T., ZHIWEN, W., HOTTA, Y., YAMADA, S., FUJI, T., FUKUDA, S., TSURUMARU, N., KUWAHARA, T., KIKUMORI, T., KOIDE, Y., FUJIMOTO, Y., NAKASHIMA, T., HIROOKA, Y., SHIKU, H., TANAKA, M., TAKESAKO, K., KONDO, T., ALEKSIC, B., KAWASHIMA, H., GOTO, H., NISHIYAMA, Y. - **Phase I dose-escalation clinical trial of HF10 oncolytic herpes virus**

in 17 Japanese patients with advanced cancer. Hepato-gastroenterology. 61:131 (2014) 599-605.

KELLY, E., RUSSELL, S. J. - **History of Oncolytic Viruses: Genesis to Genetic Engineering.** Molecular Therapy. 15:4 (2007) 651–659.

KELLY, K., NAWROCKI, S., MITA, A., COFFEY, M., GILES, F. J., MITA, M. - **Reovirus-based therapy for cancer.** Biol. Ther. 9:7 (2009) 817–830.

LI, J., ZENG, W., HUANG, Y., ZHANG, Q., HU, P., RABKIN, SD., LIU, R. - **Treatment of breast cancer stem cells with oncolytic herpes simplex virus.** Cancer Gene Therapy. 19:10 (2012) 707–714.

LI, L., LIU, S., HAN, D., TANG, B., MA, J. - **Delivery and Biosafety of Oncolytic Virotherapy.** Frontiers in Oncology. 10:475 (2020) 1–15.

LI, X., LEWIS, M. T., HUANG, J., GUTIERREZ, C., OSBORNE, C. K., WU, M-F., HILSENBECK, S. G., PAVLICK, A., ZHANG, X., CHAMNESS, G. C., WONG, H., ROSEN, J., CHANG, J. C. - **Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy.** Journal of the National Cancer Institute. 100:9 (2008) 672–679.

LIIKANEN, I., TÄHTINEN, S., GUSE, K., GUTMANN, T., SAVOLA, P., OKSANEN, M., KANERVA, A., HEMMINKI, A. - **Oncolytic adenovirus expressing monoclonal antibody trastuzumab for treatment of HER2-positive cancer.** Molecular Cancer Therapeutics. 15:9 (2016) 2259–2269.

LIU, S., CONG, Y., WANG, D., SUN, Y., DENG, L., LIU, Y., MARTIN-TREVINO, R., SHANG, L., MCDERMOTT, S. P., LANDIS, M. D., HONG, S., ADAMS, A., D'ANGELO, R., GINESTIER, C., CHARAFE-JAUFFRET, E., CLOUTHIER, S. G., BIRNBAUM, D., WONG, S. T., ZHAN, M., CHANG, J. C., WICHA, M. S. - **Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts.** Stem Cell Reports. 2:1 (2014) 78–91.

MANSO, L., VILLAGRASA, P., CHIC, N., CEJALVO, J. M., IZARZUGAZA, Y., CANTOS, B., VLANCH, S., JUAN, M., GONZÁLEZ-FARRÉ, B., LAEUFLE, R., NUOVO, G., WILKINSON, G., COFFEY., GONZÁLEZ, A., MARTÍNEZ, D., PARÉ, L., SALVADOR, F., GONZALÉZ-FARRÉ, X., PRAT, A., GREGORI, J. G. - **A window-of-opportunity Study with atezolizumab and the oncolytic virus pelareorep in early Breast Cancer (REO-027, AWARE-I).** e-Poster. In: European Society for Medical Oncology Breast Cancer Virtual Meeting, 2020. [Acedido a 3 de junho de 2020]. Disponível em:

https://dl1io3yog0oux5.cloudfront.net/_2fd8aadfc0ba0b155eccdffdb4f171c7/oncolyticsbiotech/db/343/2526/pdf/41P_Biomarkers_Luis_Manso.pdf.

MARCATO, P., DEAN, C. A., GIACOMANTONIO, C. A., LEE, P. WK. - **Oncolytic Reovirus Effectively Targets Breast Cancer Stem Cells**. *Nature*. 17:6 (2009) 972–979.

MARCHINI, A., BONIFATI, S., SCOTT, E. M., ANGELOVA, A. L., ROMMELAERE, J. - **Oncolytic parvoviruses: from basic virology to clinical applications**. *Virology Journal*. 12:1 (2015) 1-16.

MARCHINI, A., SCOTT, E. M., ROMMELAERE, J. - **Overcoming barriers in oncolytic virotherapy with HDAC inhibitors and immune checkpoint blockade**. *Viruses*. 8:1 (2016) 1–22.

MARELLI, G., HOWELLS, A., LEMOINE, N. R., WANG, Y. - **Oncolytic viral therapy and the immune system: A double-edged sword against cancer**. *Frontiers in Immunology*. 9 (2018) 866.

MIRANDA, N., PORTUGAL, C., NOGUEIRA, P. J., FARINHA, C. S., OLIVEIRA, A. L., SOARES, A. P., ALVES, M. I., MARTINS, J., MENDANHA, T., ROSA, M. V., SILVA, C., SERRA, L. - **Portugal – Doenças oncológicas em números, 2015**. Programa nacional para as doenças oncológicas. Lisboa: Direção-Geral da Saúde; 2016.

MORRIS, D. G., FENG, X., DIFRANCESCO, L. M., FONSECA, K., FORSYTH, P. A., PATERSON, A. H., COFFEY, M. C., THOMPSON, B. - **REO-001: A phase I trial of percutaneous intralesional administration of reovirus type 3 dearing (Reolysin®) in patients with advanced solid tumors**. *Investigational New Drugs*. 31:3 (2013) 696–706.

MOSTAFA, A. A., MEYERS, D. E., THIRUKKUMARAN, C. M., LIU, P. J., GRATTON, K., SPURRELL, J., SHI, Q., THAKUR, S., MORRIS, D. G. - **Oncolytic reovirus and immune checkpoint inhibition as a novel immunotherapeutic strategy for breast cancer**. *Cancers*. 10:6 (2018) 1–18.

MUHARRAM, G., RHUN, E. L., LOISON, I., WIZLA, P., RICHARD, A., MARTIN, N., ROUSSEL, A., BEGUE, A., DEVOS, P., BARANZELLI, M. C., BONNETERRE, J., CAILLET-FAUQUET, P., STEHELIN, D. - **Parvovirus H-1 induces cytopathic effects in breast carcinoma-derived cultures**. *Breast Cancer Res Treat*. 121:1 (2010) 23–33.

NGUYEN, H-M., GUZ-MONTGOMERY, K., SAHA, D. - **Oncolytic Virus Encoding a Master Pro-Inflammatory Cytokine Interleukin 12 in Cancer Immunotherapy**. *Cells*. 9:2 (2020) 400.

NGUYEN, N. P., ALMEIDA, F. S., CHI, A., NGUYEN, L. M., COHEN, D., KARLSSON, U., VINH-HUNG, V., - **Molecular biology of breast cancer stem cells: Potential clinical applications.** Cancer Treatment Reviews. 36:6 (2010) 485–491.

ONCOLYTICS BIOTECH - **Oncolytics Biotech® and PrECOG Announce Collaboration for BRACELET-I (PrE0113) Study in Metastatic Breast Cancer** [Online]. Oncolytics Biotech, 2019. [Acedido a 24 de abril de 2020]. Disponível em: <https://www.oncolyticsbiotech.com/press-releases/detail/479/oncolytics-biotechr-and-precog-announce-collaboration-for>

OTTOLINO-PERRY, K., DIALLO, J. S., LICHTY, B. D., BELL, J. C., MCCART, J. A. - **Intelligent design: Combination therapy with oncolytic viruses.** Molecular Therapy. 18:2 (2010) 251–263.

PALOMERAS, S., RUIZ-MARTÍNEZ, S., PUIG, T. - **Targeting breast cancer stem cells to overcome treatment resistance.** Molecules. 23:9 (2018) 2193.

PANDHA, H., SIMPSON, G., RELPH, K., MELCHER, A., HARRINGTON, K. - **Cancer immunotherapy via combining oncolytic virotherapy with chemotherapy: recent advances.** Oncolytic Virotherapy. 5 (2016) 1-13.

PHILLIPS, T. M., MCBRIDE, W. H., PAJONK, F. - **The response of CD24-/low/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation.** Journal of the National Cancer Institute. 98:24 (2006) 1777–1785.

PRESTWICH, R. J. D., HARRINGTON, K. J., PANDHA, H. S., VILE, R. G., MELCHER, A. A., ERRINGTON, F. - **Oncolytic viruses: A novel form of immunotherapy.** Expert Review of Anticancer Therapy. 8:10 (2008) 1581–1588.

RANKI, T., KANERVA, A., RISTIMAKI, A., HAKKARAINEN, T., SARKIOJA, M., KANGASNIEMI, L., RAKI, M., LAAKKONEN, P., GOODISON, S., HEMMINKI, A. - **A heparan sulfate-targeted conditionally replicative adenovirus, Ad5.pk7-D24 , for the treatment of advanced breast cancer.** Gene Therapy. 14. (2007) 58–67.

RIBACKA, C., HEMMINKI, A. - **Virotherapy as An Approach Against Cancer Stem Cells.** Current Gene Therapy. 8:2 (2008) 88–96.

RODRÍGUEZ, C. E., BERARDI, D. E., ABRIGO, M., TODARO, L. B., BAL DE KIER JOFFÉ, E. D., FISZMAN, G. L. - **Breast cancer stem cells are involved in Trastuzumab resistance through the HER2 modulation in 3D culture.** Journal of Cellular Biochemistry. 119:2 (2018) 1381–1391.

RODRIGUEZ, D., RAMKAIRSINGH, M., LIN, X., KAPOOR, A., MAJOR, P., TANG, D. - **The central contributions of breast cancer stem cells in developing resistance to endocrine therapy in Estrogen Receptor (ER)-positive breast cancer.** *Cancers*. 11:7 (2019) 1028.

RUSSELL, S. J., BARBER, G. N., - **Oncolytic Viruses as Antigen-Agnostic Cancer Vaccines.** *Cancer Cell*. 33:4 (2018) 599–605.

RUSSELL, S. J., PENG, K. W. - **Oncolytic Virotherapy: A Contest between Apples and Oranges.** *Molecular Therapy*. 25:5 (2017) 1107–1116.

RUSSELL, S. J., PENG, K. W., BELL, J. C. - **Oncolytic virotherapy.** *Nature Biotechnology*. 30:7 (2012) 658–670.

SAHIN, T. T., KASUYA, H., NOMURA, N., SHIKANO, T., YAMAMURA, K., GEWEN, T., KANZAKI, A., FUJII, T., SUGAE, T., IMAI, T., NOMOTO, S., TAKEDA, S., SUGIMOTO, H., KIKUMORI, T., KODERA, Y., NISHIYAMA, Y., NAKAO, A. - **Impact of novel oncolytic virus HF10 on cellular components of the tumor microenvironment in patients with recurrent breast cancer.** *Cancer Gene Therapy*. 19:4 (2012) 229–237.

SHAYESTEHPOUR, M., MOGHIM, S., SALIMI, V., JALILVAND, S., YAVARIAN, J., ROMANI, B., MOKHTARI-AZAD, T. - **Targeting human breast cancer cells by an oncolytic adenovirus using microRNA-targeting strategy.** *Virus Research*. 240. (2017) 207-214.

SURYAWANSHI, Y. R., ZHANG, T., ESSANI, K. - **Oncolytic viruses: emerging options for the treatment of breast cancer.** *Medical Oncology*. 34:3 (2017) 43.

TANG, Y., WANG, Y., KIANI, M. F., WANG, B. - **Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer.** *Clinical Breast Cancer*. 16:5 (2016) 335-343.

TAO, J. J., VISVANATHAN, K., WOLFF, A. C. - **Long term side effects of adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer.** *Breast*. 24 (2015) S149–S153.

VINOGRADOV, S., WEI, X. - **Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine.** *Nanomedicine*. 7:4 (2012) 597–615.

WAKS, A., WINER, E. P. - **Breast Cancer Treatment: A Review.** *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 321:3 (2019) 288–300.

WANG, H., CHEN, N. G., MINEV, B. R., SZALAY, A. A. - **Oncolytic vaccinia virus GLV-1h68 strain shows enhanced replication in human breast cancer stem-like cells in comparison to breast cancer cells.** *Journal of Translational Medicine*. 10:167 (2012) 1–15.

WANG, J., HU, P., ZENG, M., RABKIN, S. D., LIU, R. - **Oncolytic herpes simplex virus treatment of metastatic breast cancer.** *International Journal of Oncology.* 40:3 (2012) 757–763.

WHO, World Health Organization. Cancer. Cancer prevention. **Early Diagnosis and Screening. Breast Cancer.** [Em Linha] Geneva : WHO [Acedido a 06 abril 2020]. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>

YE, D., SHEN, Z., ZHOU, S. - **Function of microRNA-145 and mechanisms underlying its role in malignant tumor diagnosis and treatment.** *Cancer Management and Research.* 11 (2019) 969–979.

ZEH, H., DOWNS-CANNER, S., MCCART, J. A., GUO, Z. S., RAO, U. NM., RAMALINGAM, L., THORNE, S. H., JONES, H. L., KALINSKI, P., WIECKOWSKI, E., O'MALLEY, M. E., DANESHMAND, M., HU, K., BELL, J. C., HWANG, T-H., MOON, A., BREITBACH, C. J., KIRN, D. H., BARTLETT, D. L. - **First-in-man study of western reserve strain oncolytic vaccinia virus: Safety, systemic spread, and antitumor activity.** *Molecular Therapy.* 23:1 (2015) 202–214.

ZENG, W., HU, P., WU, J., WANG, J., LI, J., LEI, L., LIU, R. - **The oncolytic herpes simplex virus vector G47 Δ effectively targets breast cancer stem cells.** *Oncology Reports.* 29:3 (2013a) 1108–1114.

ZENG, W. G., LI, J. J., HU, P., LEI, L., WANG, J. N., LIU, R. B. - **An oncolytic herpes simplex virus vector, G47 Δ , synergizes with paclitaxel in the treatment of breast cancer.** *Oncology Reports.* 29:6 (2013b) 2355–2361.

ZHANG, Q., YU, Y. A., WANG, E., CHEN, N., DANNER, R. L., MUNSON, P. J., MARINCOLA, F. M., SZALAY, A. A. - **Eradication of Solid Human Breast Tumors in Nude Mice with an Intravenously Injected Light-Emitting Oncolytic Vaccinia Virus.** *Cancer Research.* 67:20 (2007) 10038–10047.

ZHAO, J. - **Cancer stem cells and chemoresistance: The smartest survives the raid.** *Pharmacology and Therapeutics.* 160 (2016) 145–158.

ZHAO, Q., ZHANG, W., NING, Z., ZHUANG, X., LU, H., LIANG, J., LI, J., ZHANG, Y., DONG, Y., ZHANG, Y., ZHANG, S., LIU, S., LIU, B. - **A novel oncolytic herpes simplex virus type 2 has potent anti-tumor activity.** *PLoS ONE.* 9:3 (2014) 1–11.

ZHENG, M., HUANG, J., TONG, A., YANG, H. - **Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Barriers and Recent Advances.** *Molecular Therapy - Oncolytics.* 15:37 (2019) 234–247.

ZHUANG, X., ZHANG, W., CHEN, Y., HAN, X., JIE, L., ZHANG, Y., ZHANG, Y., ZHANG, S., LIU, B. - **Doxorubicin-enriched, ALDH^{br} mouse breast cancer stem cells are treatable to oncolytic herpes simplex virus type I.** BMC Cancer. 12 (2012) 1.