

Nelson Emanuel de Carvalho Fortuna

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Glioblastoma Multiforme: biomarcadores e perspectiva atual e futura da terapêutica” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, do Dr. João Pimentel, da Dra. Ana Nunes e da Professora Doutora Armanda Emanuela Castro e Santos apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Imagem de capa adaptada de:
<https://www.wfdd.org/story/john-mccain-was-diagnosed-glioblastoma-among-deadliest-cancers>

Nelson Emanuel de Carvalho Fortuna

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Glioblastoma Multiforme: biomarcadores e perspetiva atual e futura da terapêutica” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, do Dr. João Pimentel, da Dra. Ana Nunes e da Professora Doutora Armanda Emanuela Castro e Santos apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Nelson Emanuel de Carvalho Fortuna, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2012146028, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Glioblastoma Multiforme: Biomarcadores e Perspetiva Atual e Futura da Terapêutica” 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, 15 de setembro de 2017.



Agradecimentos

Aos meus pais, Paulo Fortuna e Vera Carvalho, por todo o apoio proporcionado ao longo destes 5 anos, sem eles tudo isto seria impossível.

À minha restante família, pela preocupação constante e presença em todos os momentos da minha vida.

À Beatriz Mestre, pelo amor e paciência durante todos estes anos complicados.

Às amigas de Foz Côa, Flávio Maximino, João Pires, José Pires e João Paulo.

Às amigas de Coimbra, André Lourenço, Mariana Zagalo, Rúben Simão e Tiago Branco.

Aos amigos estagiários, Daniel Magano e João Brazão.

À Imperial TAFFUC, pelas incontáveis aventuras vividas nestes anos.

À Farmácia Adriana, D. Adélia, Dr^a Ângela, Dr^a Joana e ao Dr. João, por me terem recebido tão bem e por todas as experiências vividas.

Queria agradecer à Professora Doutora Armanda Santos, pelo esforço, apoio e orientação.

A Coimbra...

Índice

Glioblastoma Multiforme: Biomarcadores e Perspetiva Atual e Futura da Terapêutica	5
Abreviaturas.....	6
Resumo	8
Abstract	9
1. Introdução.....	10
2. Epidemiologia	11
2.1 Incidência e Fatores de Risco	11
3. GBM primário e secundário	12
4. Biomarcadores para o GBM	13
4.1 O(6)-Metilguanina-DNA Metiltransferase (MGMT)	14
4.2 Mutações no gene IDH	15
4.3 Mutação na ATRX	16
4.4 Mutações do H3F3A (variante da histona H3.3).....	16
4.5 Mutação do promotor do gene da telomerase transcriptase reversa TERT.....	17
4.6 Perda de heterozigotia (LOH) de 10q e 10p.....	17
4.7 Mutações do gene supressor tumoral p53.....	18
4.8 Via TP53/MDM2/MDM4/p14 ^{ARF}	18
4.9 Via EGFR/RAS/NFI/PTEN/PI3K.....	19
4.10 Via p16 ^{INK4a} /CDK4/RBI	20
5. Mecanismos associados à neovascularização	21
5.1 Vasos sanguíneos tumorais	21
5.2 Angiogénese no GBM.....	22
5.2.1 Angiogénese independente de hipóxia	25
5.3 Vasculogénese.....	25
5.4 Mecanismos alternativos da neovascularização	26
5.4.1 Mimetismo vasculogénico.....	26
5.4.2 Transdiferenciação das células cancerígenas em células endoteliais.....	27
6. Compreensão da farmacoterapia no GBM.....	28
6.1 Nitrosoureas.....	29
6.2 Temozolomida (TMZ).....	29
6.3 EGFR como alvo terapêutico	30
6.4 Bevacizumab.....	31
7. Terapias emergentes	32
7.1 Vírus Zika com atividade oncolítica contra as células estaminais do GBM.....	32
7.2 Terapêutica no GBM dirigida à p53 mutante.....	33

8. Conclusão	35
9. Bibliografia.....	36
Relatório de Farmácia Comunitária.....	40
Abreviaturas.....	41
1. Nota Introdutória.....	42
2. Análise SWOT	43
2.1 Pontos Fortes	43
2.1.1 Integração na equipa da Farmácia Adriana	43
2.1.2 Diversidade das funções executadas.....	43
2.1.3 Protocolos com instituições	44
2.2 Pontos Fracos	44
2.2.1 Preparação de medicamentos manipulados.....	44
2.2.2 Localização	44
2.2.3 Variedade de produtos veterinários	45
2.3 Oportunidades.....	45
2.3.1 <i>Sifarma 2000</i> [®]	45
2.3.2 Desenvolvimento de competência sociais	46
2.4 Ameaças.....	46
2.4.1 Conjuntura económica.....	46
2.4.2 Venda de MNSRM fora das Farmácias.....	47
3. Aconselhamento Farmacêutico	47
3.1 Caso Clínico 1	47
3.2 Caso Clínico 2	48
4. Conclusão	48
4. Bibliografia.....	49
Relatório de Indústria Farmacêutica.....	50
Abreviaturas.....	51
1. Introdução.....	52
2. Análise SWOT	53
2.1 Pontos Fortes	53
2.1.1 Recursos Humanos	53
2.1.2 Grupo FHC Farmacêutica	53
2.1.3 Adquirir conhecimentos sobre as Boas Práticas de Distribuição (BPD)	53
2.1.4 Aprofundar conceitos relativos aos dispositivos médicos (DMs)	53
2.1.5 Norma ISO 9001	54
2.1.6 Visita às instalações do armazém FHC.....	54

2.1.7 Sistema informático Primavera.....	55
2.2 Pontos fracos	55
2.2.1 Presença simultânea de dois estagiários	55
2.2.2 Sazonalidade do estágio	55
2.3 Oportunidades.....	56
2.3.1 Nichos de mercado.....	56
2.3.2 Auditoria externa	56
2.4 Ameaças.....	57
2.4.1 Pouco conhecimento prévio sobre a área dos dispositivos médicos.....	57
2.4.2 Empresas multinacionais	57
2.4.3 Codificação dos produtos pelo INFARMED	57
3. Conclusão.....	58
4. Bibliografia	59

Glioblastoma Multiforme: Biomarcadores e Perspetiva Atual e Futura da Terapêutica

Abreviaturas

2HG – *2-hydroxyglutarate* / 2-hidroxiglutarato

ABC – *ATP-binding cassette*

AKT – *Protein kinase B* / Proteína cinase B

ALT – *Alternative Lengthening Mechanisms*

Ang – *Angiopoietin* / Angiopoietina

ATM – *Ataxia-telangiectasia mutated kinase* / Proteína ataxia-telangiectasia mutada

ATP – *Adenosine triphosphate* / Adenosina trifosfato

ATR – *Ataxia Telangiectasia And Rad3 Related Protein* / Proteína ataxia-telangiectasia relacionada com Rad3

ATRX – *Alpha thalassemia mental retardation syndrome X linked* / Síndrome alfa-talassemia - atraso mental, ligado ao X

BHE – *Blood-brain barrier* / Barreira hematoencefálica

CDK4 – *Cyclin-dependent kinase 4* / Cinase dependente de ciclina 4

CDKN2A – *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* / Inibidor da cinase dependente de ciclina 2A

CENUs – *Chloroethylnitrosourea* / Cloro-etil-nitrosoureas

CIMP – *CpG island methylator phenotype* / Fenótipo Metilador das Ilhas CPGs

CNS/SNC – *Central Nervous System* / Sistema Nervoso Central

CpG – *Cytosine-phosphate-guanine* / Dinucleótido de citosina e guanina

DAXX – *Death Domain Associated Protein* / Proteína associada aos domínios de morte

DLL-4 – *Delta-like 4*

DNA – *Deoxyribonucleic acid* / Ácido desoxirribonucleico

EGF – *Epidermal growth factor* / Fator de crescimento epidérmico

EGFR – *Epidermal growth factor receptor* / Recetor do fator de crescimento epidérmico

EPC – *Endothelial progenitor cell* / Células progenitoras endoteliais

GBM – Glioblastoma Multiforme

GFAP – *Glial fibrillary acidic protein* / Proteína ácida fibrilar glial

GFP – *Green fluorescent protein* / Proteína verde fluorescente

HIF – *Hypoxia inducible factor* / Fator indutor de hipóxia

HRE – *Hypoxia response element* / Elemento de resposta à hipóxia

ICD – *Intracellular domain* / Domínio intracelular

IDH – *Isocitrate dehydrogenase* / Isocitrato desidrogenase

IL-8 – *Interleukin-8* / Interleucina-8

LOH – *Loss of heterozygosity* / Perda de heterozigotia

- MDM2** – *murine double minute 2* / Minuto duplo murino 2
- MDM4** – *murine double minute 4* / Minuto duplo murino 4
- MGMT** – *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase* / O-6-metilguanina-DNA metiltransferase
- MIF** – *Migration inhibitory factor* / Fator de inibição da migração de macrófagos
- MMPs** – *Matrix metalloproteinases* / Metaloproteínases da matriz
- mTOR** – *Mammalian target of rapamycin* / Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
- NAD** – *Nicotinamide adenine dinucleotide* / Dinucleótido de nicotinamida e adenina
- NADP** – *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* / Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
- NFI** – *Neurofibromin 1* / Neurofibromina 1
- OMS** – Organização Mundial de Saúde
- PDGF** – *Platelet-derived growth factor* / Fator de crescimento derivado de plaquetas
- PDGFR** – *Platelet-derived growth factor receptor* / Recetor do fator de crescimento derivado de plaquetas
- PI3K** – *phosphatidylinositol 3 kinase* / Cinase-3 do fosfatidilinositol
- pRB/RB** – *Retinoblastoma protein* / Proteína do Retinoblastoma
- PTEN** – *Phosphatase and tensin homolog* / Homólogo da fosfatase e da tensina
- RBI** – *Retinoblastoma gene* / Gene do retinoblastoma
- RTK** – *Receptor tyrosine kinase* / Recetor tirosina-cinase
- SDF1** – *Stromal cell-derived factor 1*
- SWI2/SNF2** – *Switching/sucrose nonfermenting chromatin-remodeling complex*
- TERT** – *Telomerase Reverse Transcriptase* / Telomerase transcriptase reversa
- TFG- α** – *Transforming growth factor-alpha* / Fator de crescimento tumoral-alfa
- Tie** – *Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains*
- TKI** – *Tyrosine kinase inhibitor* / Inibidor de atividade tirosina cinase
- TMZ** – *Temozolomide* / Temozolomida
- TP53** – *Tumor protein p53* / Proteína tumoral p53
- VEGF** – *Vascular endothelial growth factor* / Fator de crescimento endotelial vascular
- VEGFR** – *Vascular endothelial growth factor receptor* / Recetor do fator de crescimento endotelial vascular
- ZIKV** – *Zika Virus* / Vírus Zika

Resumo

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor cerebral primário mais letal nos adultos apesar da qualidade elevada das estratégias terapêuticas contemporâneas de primeira linha. Este tipo de tumor ocorre em praticamente todos os pacientes e não existe um tratamento padrão comum aceite para a fase de reincidência da doença. Desenvolvimentos extensos no diagnóstico e tratamento têm sido realizados, de modo a melhorar a expectativa de vida dos pacientes. Contudo, relativamente poucas melhorias no prognóstico da doença têm sido alcançadas. Dos maiores desafios atualmente enfrentados pela neuro-oncologia são as várias barreiras existentes ao tratamento efetivo do GBM, incluindo uma interface fortemente controlada entre a corrente sanguínea e o sistema nervoso central (SNC), um espaço extracelular do tumor tortuoso e restrito contendo uma rede densa de proteínas e glicosaminoglicanos, e ainda a heterogeneidade e instabilidade genómica do GBM. O desenvolvimento robusto e agressivo, juntamente com as dificuldades da ressecção completa, a distribuição do fármaco e a resistência à terapêutica do tratamento são os principais problemas que o GBM apresenta. Apesar disso, a pesquisa terapêutica levou a desenvolvimentos de estratégias de tratamento inovadoras que são promissoras no combate desta doença.

Palavras-chave: Glioblastoma, vias de sinalização, mutações, primário, secundário, terapia.

Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most lethal primary brain tumor in adults despite contemporary gold-standard first-line treatment strategies. This type of tumor recurs in virtually all patients and no commonly accepted standard treatment exists for the recurrent disease. Extensive developments in diagnosis and treatment have been made in order to enhance the patients' life expectancy. However, relatively little improvement on prognosis has been achieved. Among the biggest challenges currently faced by neuro-oncology are the several barriers that exist to the effective treatment of GBM including the tightly controlled interface between the bloodstream and central nervous system (CNS), a narrow and tortuous tumor extracellular space containing a dense meshwork of proteins and glycosaminoglycans, and genomic heterogeneity and instability. Aggressive and robust development, coupled with difficulties of complete resection, drug delivery and therapeutic resistance to treatment are some of the main issues that GBM presents. Despite that, therapeutic research leading to developments in novel treatment strategies show promise in combating this disease.

Keywords: Glioblastoma, signalling pathways, mutations, primary, secondary, therapy.

I. Introdução

O Glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor cerebral primário mais comum e agressivo nos adultos. As características histopatológicas que o definem são a necrose e a proliferação endotelial, resultando na atribuição do grau IV, o grau mais elevado na classificação de tumores cerebrais da Organização Mundial de Saúde (OMS). O GBM mantém-se como uma doença incurável com uma taxa de sobrevivência de 15 meses, recebendo tratamentos agressivos, e 4 meses sem qualquer tipo de terapia. O tratamento é complexo e inicialmente consiste numa ressecção cirúrgica de segurança máxima seguida de radioterapia em conjunto com a quimioterapia de temozolomida (TMZ) seguido de seis ciclos de TMZ em monoterapia.[1]

Os glioblastomas exibem uma extensa heterogeneidade morfológica e molecular, em resultado da proveniência de diferentes populações de astrócitos e, possivelmente, de linhagens ependimárias e oligodendrocíticas. Contudo, os glioblastomas são originários, sobretudo, de células anaplásticas de astrócitos, apresentam pleomorfismo nuclear evidente, necrose e proliferação endotelial vascular. Estas células tumorais estão arranjadas de forma radial em relação à região necrótica e ocorrem com maior frequência no cérebro adulto.[2]

O glioblastoma é caracterizado por um crescimento rápido e altamente invasivo, uma neovascularização extensa e alta mortalidade. A falta de sucesso na terapia resulta essencialmente da infiltração de células tumorais individuais entre as células parenquimais da área cerebral envolvente, impedindo a ressecção completa do glioblastoma. Este processo é facilitado por dois processos relacionados: o primeiro é a angiogénese que é a criação de novos vasos sanguíneos a partir da vasculatura preexistente, em resposta a estimulação química externa; e o segundo é a vasculogénese, a reorganização de células distribuídas aleatoriamente para uma rede de vasos sanguíneos.[3]

Os GBMs compreendem os subtipos primário e secundário que evoluem de diferentes mutações genéticas, afetando pacientes com idades diferentes e apresentando diferentes consequências. Os GBMs primários (*de novo*) fazem parte de 80% dos GBMs e ocorrem em pacientes mais velhos (idade média de 62 anos). Os GBMs secundários, referentes a uma minoria dos glioblastomas, desenvolvem-se a partir de gliomas previamente diagnosticados de grau inferior e ocorrem em pacientes mais novos (idade média de 45 anos). A OMS acrescentou, recentemente, um subtipo raro de GBM, denominado “com componente oligodendroglioma” que é definido por um glioblastoma contendo áreas que se assemelham ao oligodendroglioma anaplástico com características intrínsecas ao GBM, necrose com ou sem proliferação microvascular.[1]

2. Epidemiologia

Os glioblastomas constituem de 45,2% dos tumores malignos cerebrais, contudo a sua incidência anual é de 3,1 por 100-000, o que é considerado um valor baixo comparando com o dos cancros que surgem noutros órgãos, tais como na mama (171,20 por 100-000) ou na próstata (201,40 por 100-000). [4]

2.1 Incidência e Fatores de Risco

Idade – A incidência anual do GBM ajustada à idade aumenta de 0.15 por 100-000 em crianças para 15.03 por 100-000 em pacientes com idades compreendidas entre os 75 e os 84 anos. A sobrevivência é inversamente associada com a idade: 5% de todos os pacientes diagnosticados com glioblastoma estão vivos após 5 anos, e este valor vai diminuir para 2% entre pacientes com 65 ou mais anos.

Fatores de risco para o desenvolvimento de glioblastoma além dos da idade estão insuficientemente definidos. No entanto, diferenças na incidência e na taxa de mortalidade, deste cancro em específico, baseadas na raça e grupos étnicos assim como no género, sugere potenciais variáveis biológicas e ambientais identificáveis.[5]

Género – Uma incidência maior do GBM foi reportada nos homens em comparação com as mulheres. A taxa de incidência do GBM é 1.6 vezes mais elevada nos homens em relação às mulheres com uma maior frequência dos GBMs primários nos homens (rácio homem/mulher, 1:33) e uma maior frequência de GBMs secundários nas mulheres (rácio homem/mulher, 0:65).[6]

Raça/Etnia – Os caucasianos detêm as maiores taxas de incidência de GBM, seguidos pelos negros, pelos Asiáticos/residentes das ilhas do Pacífico e pelos Índios Americanos/Nativos do Alasca. Desde 2006 até 2010, os caucasianos tiveram o dobro da taxa de incidência comparado com os negros e os não-Hispânicos tiveram uma maior taxa de incidência comparado com os Hispânicos.[7]

Subtipos de Glioblastoma – Num estudo[8] conduzido em Canton de Zurique, Suíça, observaram-se 715 novos casos diagnosticados de glioblastoma na população residente (1.16 milhões). Em 38 glioblastomas (5.3% de todos os glioblastomas na população), existiam provas clínicas e histopatológicas de uma progressão de uma lesão precursora menos maligna, e estes foram diagnosticados como GBMs secundários. Os restantes 677 pacientes com GBM (94.7%) não exibiam tais evidências de evolução de uma lesão precursora menos maligna, sendo classificados como glioblastoma primário.[8]

Local – Os GBMs localizam-se geralmente na região supratentorial (lobos frontal, temporal, parietal e occipital), são raramente encontrados no cerebelo e ainda mais raramente na medula espinhal. Quando comparados com a região supratentorial, os GBMs no cerebelo ocorriam em pacientes mais novos, com menor frequência nos caucasianos e apresentavam um tamanho inferior. O GBM cerebelar é de rara ocorrência nos adultos, fazendo parte de 0.4-3.4% de todos os GBMs. Pacientes com GBM cerebelar são significativamente mais novos do que aqueles com tumores supratentoriais, sendo a idade média dos primeiros compreendida entre 50-56 anos e dos últimos 62-64 anos. O GBM tem uma incidência mais elevada de tumores no lobo frontal e de tumores que envolvem dois ou mais lobos, seguidos dos tumores nos lobos temporal e parietal.[1]

3. GBM primário e secundário

A apresentação clínica do glioblastoma poderá ser primária, com um neoplasma de grau IV, ou secundária, no qual o GBM surge ao longo do tempo a partir de um glioma infiltrativo de baixo grau. [9] Atualmente, reconhecem-se duas vias gerais para a gênese do glioblastoma: tumores que degeneram de lesões de grau inferior e tumores *de novo* que apresentam um início abrupto. Sabe-se que as lesões *de novo* estão associadas à amplificação do gene do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), a mutações do homólogo da fosfatase e da tensina (PTEN), à perda de heterozigotia (LOH) do cromossoma 10 e mais raramente a mutações do gene da proteína tumoral p53 (TP53).[5][10][11]

Astrocitomas de grau inferior manifestam mutações da p53 e amplificação do gene do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), frequentemente adquirem LOH do cromossoma 19q em graus intermediários e, por fim, adquirem LOH do cromossoma 10 com transformação para grau IV, glioblastoma secundário. Assim, as mutações do TP53 são frequentes nos GBM secundários, mas as mutações no PTEN e a amplificação gene do EGFR raras. Independentemente de se tratar de um GBM primário ou secundário, em 60% dos casos estão presentes alterações no cromossoma 10: perda total ou parcial do 10p, do 10q ou de certas regiões como as 10p14-p15, 10q23-24, 10q25pter, o que sugere a possível existência de vários genes supressores de tumores além do PTEN localizado no 10q23-3.[10]

Recentemente, surgem cada vez mais evidências de mutações no gene isocitrato desidrogenase I (IDHI) nos GBMs secundários, mas que raramente ocorrem nos GBMs primários, reforçando a necessidade de distinguir os dois tipos de glioblastoma e permite ainda, um avanço na compreensão da gênese dos gliomas.[9] Contudo, nenhuma destas

alterações genéticas assegura uma separação fidedigna destes subtipos de glioblastoma. Uma vez que, os glioblastomas primário e secundário são histologicamente indistinguíveis, a classificação em subtipos manteve-se como conceito sem ser usada para diagnóstico ou para decisões de tratamento.[12]

4. Biomarcadores para o GBM

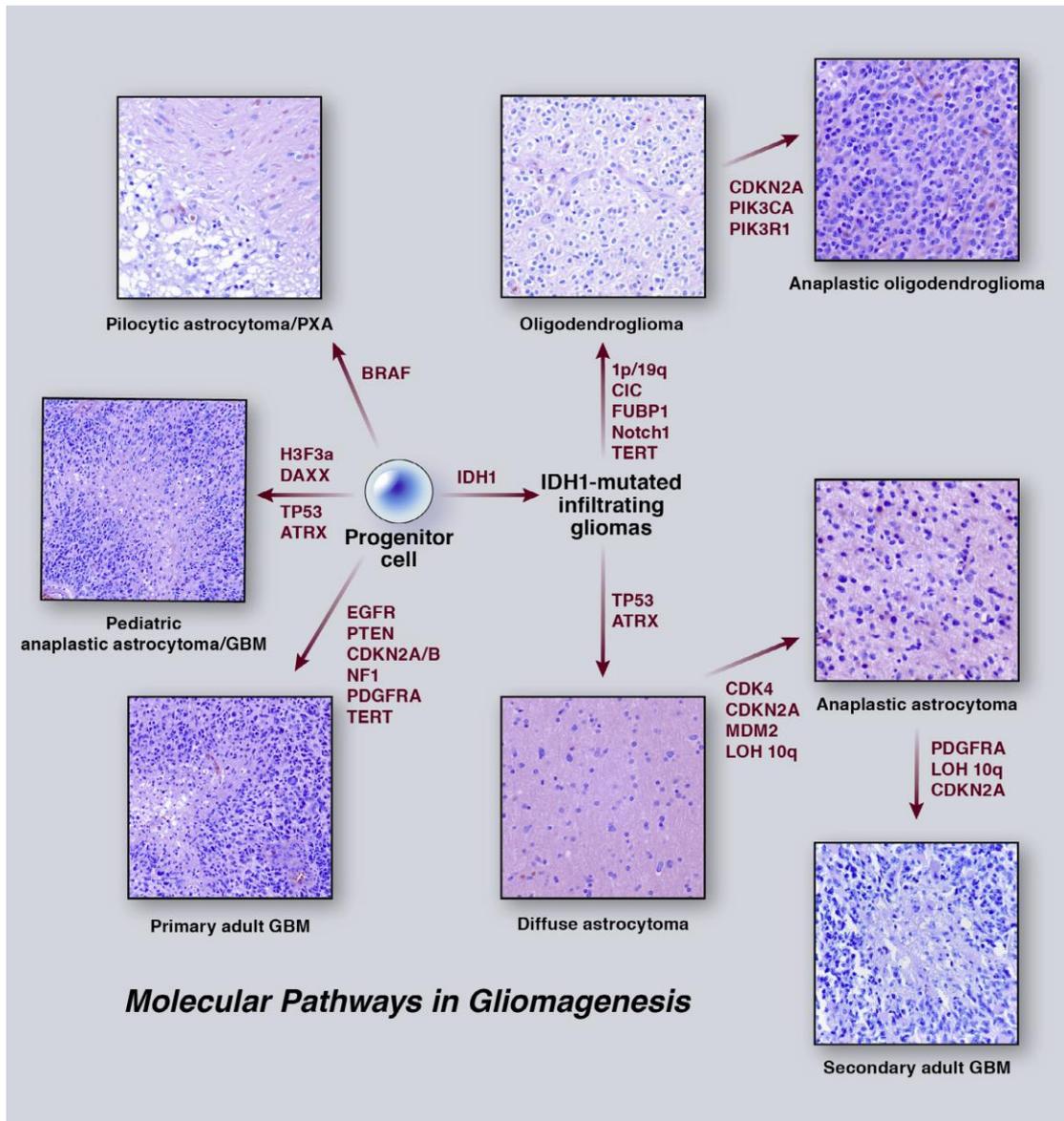


Fig. 1. Perspetiva dos genes alterados nos tipos específicos de glioma [9]

4.1 O(6)-Metilguanina-DNA Metiltransferase (MGMT)

O gene da enzima MGMT, que atua na reparação do DNA, está localizado no 10q26 e tem vindo a ser cada vez mais objeto de estudo devido à sua associação com a resistência a agentes alquilantes usados como antitumorais. Apesar da MGMT estar expressa no tecido normal, a sua sobreexpressão pode estar presente em variados tipos de tumores, incluindo os gliomas. A MGMT consiste numa proteína de reparação específica para a remoção de adutos alquil pró-mutagénicos, formados na posição O⁶ da guanina e na posição O⁴ da timina, prevenindo assim a morte celular por apoptose. Por isso, modificações na transcrição da MGMT influenciam o sucesso da terapêutica antitumoral como os agentes alquilantes [13][14][15]

A transcrição genética pode ser alterada sem mudar a sequência de bases. Um mecanismo de tal modificação epigenética é a metilação da citosina, especialmente se esta faz parte do dinucleótido citosina-guanina (CpG). Os CpGs estão distribuídos aleatoriamente pelo genoma do ser humano. Zonas do DNA desprovidas de CpGs estão intercaladas com aglomerados ou “ilhas” de CpG. A metilação destes está associada a um silenciamento dos genes afiliados. Então, a metilação das ilhas de CpG no promotor do MGMT leva à perda de expressão. Consequentemente, a atividade reparadora do DNA diminuiria, logo células tumorais com falta de MGMT são propensas à morte celular induzida por substâncias alquilantes. Resumindo, a metilação do promotor do MGMT vai suprimir a expressão do MGMT.[16]

Recentemente, foi observado que quando adicionado à radioterapia em glioblastomas recém-diagnosticados, a temozolomida, um agente alquilante, resultou num benefício clínico com um significado estatístico expressivo e com uma toxicidade mínima adicional. Análises moleculares mostraram que os glioblastomas que continham o promotor da MGMT metilado beneficiavam da temozolomida, caso o promotor não se encontrasse metilado tal benefício não ocorreria.[16]

Cerca de 40% dos GBMs primários e mais de 70% dos GBMs secundários manifestam silenciamento epigenético do MGMT, contudo estas percentagens variam. Sendo assim, a metilação do promotor da MGMT desempenha um papel fundamental como um biomarcador preditivo para a resistência à quimioterapia. A pirosequenciação tem-se exibido como um método sensível, robusto e de fácil manuseamento para uma avaliação quantitativa da metilação do MGMT.[17]

4.2 Mutações no gene IDH

A isocitrato desidrogenase é uma enzima que participa na descarboxilação oxidativa do isocitrato produzindo α -cetoglutarato e CO_2 . Esta enzima contém 3 isoformas: IDH1, IDH2 e IDH3. A IDH3 catalisa o terceiro passo do ciclo do ácido cítrico, dentro da mitocôndria. As IDH1 e IDH2 catalisam a mesma reação, mas fora do contexto do ciclo do ácido cítrico. Enquanto a IDH3 reduz o NAD^+ a NADH , as outras duas isoformas usam o NADP^+ . Só a isoforma IDH1 se encontra localizada no citoplasma (Fig. 2).[9][18]

Mutações do gene que codifica esta enzima são descobertas relativamente recentes em muitos gliomas. Estes apresentam duas isoformas mutantes, IDH1 e IDH2 que são mutualmente exclusivas. Sendo a mutação mais frequente da IDH1 a R132H, que ocorre no codão 132, onde o aminoácido da arginina é alterado pela histidina. O mesmo ocorre para codão 172 no gene da IDH2 mitocondrial. Esta mutação vai levar a enzima a desenvolver uma afinidade preferencial para o α -cetoglutarato em vez do isocitrato, originando a produção e acumulação de 2-hidroxi-glutarato (2HG). Um excesso deste medeia uma hipermetilação global do DNA e ao fenótipo G-CIMP (glioma – Fenótipo Metilador das Ilhas CPGs) correlacionado à tumorigénese, concluindo-se que o 2HG se trata de um oncometabolito.[13][19]

As mutações IDH1 e IDH2 são a única alteração genética com elevada prevalência (>80% dos casos) em todos os gliomas difusos de grau II, e a sua frequência não se altera durante a progressão do astrocitoma difuso (grau II) para o astrocitoma anaplásico (grau III) e o glioblastoma secundário (grau IV). Como essas mutações são frequentes nos glioblastomas secundários (>80%), mas muito raras nos glioblastomas primários (<5%), a identificação dessas tornou-se um evento de carácter significativo.[12]

Esta mutação IDH1/IDH2 torna-se assim no marcador genético mais fidedigno dos glioblastomas secundários e das suas lesões

precursoras a considerar em investigações e ensaios clínicos. Assim sendo, vários métodos de deteção molecular destas mutações foram adaptados, tais como sequenciação direta e análise imunohistoquímica (p.e., anticorpos anti IDH-1-132H).[9][13]

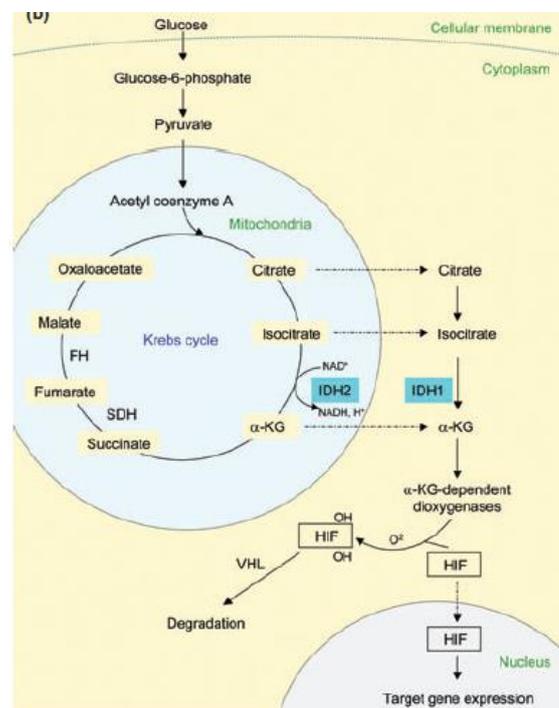


Fig. 2. Vias de sinalização major envolvidas na patogénese dos GBMs. Adaptado. [15]

Além disto, também foi demonstrado uma correlação entre a mutação IDH1/2 com um prognóstico mais favorável para pacientes com glioblastoma. Um estudo [20] demonstrou que o tempo médio de sobrevivência foi de 31 meses para 14 pacientes com glioblastoma portadores da mutação IDH1/2, contra 15 meses para 115 pacientes sem esta mutação. Considera a mutação IDH1/2 o marcador genético mais significativo para um período mais prolongado de sobrevivência nos pacientes tratados com cirurgia e radioterapia.[9][12][13]

4.3 Mutação na ATRX

O gene síndrome alfa-talassemia - atraso mental, ligado ao X (ATRX) encontra-se localizado no cromossoma Xq21.1 e é amplamente expresso no núcleo celular. A ATRX é um membro da família SWI2/SNF2 das helicases do DNA que desempenha uma função na modulação da cromatina e na manutenção dos telómeros. Está envolvida na incorporação de monómeros da histona H3.3 na cromatina, processo que é dependente da proteína chaperona de histonas associada aos domínios de morte, proteína 6 (DAXX). A perda de ATRX provoca o alongamento dos telómeros, devido ao mecanismo *Alternative Lengthening Mechanisms* (ALT) que envolve a recombinação entre telómeros e ocorre de forma independente de telomerase, levando à perda de estabilidade do genoma. Este processo ocorre na maioria dos gliomas para a reparação dos telómeros. O mecanismo pelo qual a ATRX mutada leva ao ALT não está devidamente estabelecido.[13][21]

O ATRX apresenta-se mutado em 30% dos casos de gliomas pediátricos e em 57% dos GBMs secundários nos adultos. As mutações da ATRX são mutualmente exclusivas da codeleção do 1p/19q, mas associadas com a mutação da p53, o que sugere que a ATRX poderá levar à formação de uma linhagem específica de astrocitomas. As mutações da ATRX são também observadas em 90% dos astrocitomas com IDH mutante, contudo são raros nos astrocitomas com IDH normal.[9][21]

4.4 Mutações do H3F3A (variante da histona H3.3)

A histona H3.3 está localizada na região pericentromérica e nos telómeros. Mutações recorrentes do gene H3F3A que codifica a H3.3, variante da histona 3, independente da replicação foram observadas em 31% dos GBMs, resultando numa mudança de aminoácidos, K27M ou G34R/G34V, em duas posições críticas da cauda da histona, sujeitas remodelações extensivas pós-tradução e foram encontradas em astrocitomas pediátricos de elevado grau. Estas mutações alteram a função normal do gene com função na regulação epigenética. Coincidentemente, as mutações H3F3A foram encontradas em tumores com mutações

ATRX e TP53. As mutações na H3F3A K27M foram também descritas em gliomas de elevado grau em jovens adultos.[13][22]

4.5 Mutação do promotor do gene da telomerase transcriptase reversa TERT

A proteína codificada pelo gene TERT provoca o aumento da atividade da telomerase, adicionando repetições de hexâmeros à extremidade 3' dos cromossomas. Isto vai resultar na preservação dos telómeros e inibição da indução de senescência. Mutações no promotor TERT, em vez de mutações na sequência de codificação proteica, têm sido recentemente descritas nos gliomas. Os tipos de mutação mais comuns no promotor TERT são as C228T e C250T, em que a atividade de transcrição aumentou até 4 vezes. Devido ao aumento da expressão da telomerase. Este é um dos mecanismos responsáveis pela imortalidade celular observada nos cancros, incluindo os gliomas.[13][21][23]

A incidência mais elevada foi identificada na maioria dos tumores com codeleção do 1p/19q e mutações no IDH (98%) assim como em tumores com IDH normal mas com amplificação do gene do EGFR (92%). Sendo que os primeiros correspondem a oligodendrogliomas e os últimos a GBMs primários. A frequência de mutações é relativamente baixa em astrocitomas difusos e anaplásticos (19% e 25%, respetivamente). Assim, as mutações no promotor TERT podem desempenhar um papel de relevo na identificação de GBMs com IDH não mutada.[18]

4.6 Perda de heterozigotia (LOH) de 10q e 10p

A LOH do cromossoma 10 é a alteração genética mais frequente nos glioblastomas e ocorre em 60 a 80% dos casos. Muitos dos glioblastomas parecem ter perdido uma cópia inteira do cromossoma 10 (10p e 10q). Existem pelo menos três locus em que a sua deleção é usual, estes são os 10p14-15, 10q23-24 (PTEN) e 10q25-pter, o que sugere a presença de vários genes supressores tumorais que poderão desempenhar uma função chave na sua patogénese. A LOH do 10q também é frequente nos glioblastomas secundários (70%), apesar de ser parcial na maioria dos casos. A LOH do 10q25-qter está associada com a progressão histológica de astrocitomas de baixo grau ou anaplásticos para o fenótipo de um glioblastoma de elevado grau. A LOH do 10p é de rara ocorrência nos glioblastomas secundários. A LOH do 10q está associada a uma redução da sobrevivência dos pacientes com glioblastoma.[15][24]

4.7 Mutações do gene supressor tumoral p53

TP53 é o gene mais frequentemente envolvido no cancro humano. A Proteína Tumoral p53 é um produto do gene supressor tumoral, que quando danificado pode originar instabilidade genética e comprometer a indução de apoptose. A p53 vai desempenhar um papel fundamental no controlo do ciclo celular, induzindo a transcrição de genes, tais como o gene p21 suscetível de bloquear a passagem da fase G1 para a S, no caso de DNA danificado. A TP53 provoca a apoptose em caso de danos irreversíveis no DNA.[10][13]

A perda da função da p53 resulta num crescimento contínuo das células danificadas. Mutações no TP53 foram inicialmente observadas com regularidade em astrocitomas de grau baixo e em glioblastomas secundários. Quando restringidos a astrocitomas infiltrantes com mutação IDH1/2, a presença da mutação da TP53 era ainda mais elevada, porém, em gliomas difusos com o gene IDH normal a frequência da mutação da TP53 diminuía. No estudo anteriormente referido, 939 tumores de diferentes origens celulares, 80% dos astrocitomas anaplásticos e GBMs com o IDH mutante também apresentavam mutações em TP53. [9][20]

A avaliação da sobreexpressão de p53 por métodos imunohistoquímicos tem sido fortemente usada como um marcador da mutação de p53 nos GBMs secundários. Contudo, como marcador para diagnóstico e prognóstico tem uma utilidade limitada, sendo substituído pela IDH e pelo ATRX.[13][19]

4.8 Via TP53/MDM2/MDM4/p14^{ARF}

O “turnover” da TP53 é regulado pelo MDM2 que é uma ubiquitina-proteína ligase E3. O MDM2 vai ubiquitinar a TP53 na ausência de stress. Contudo, na presença deste ocorre uma auto-ubiquitinação por parte do MDM2. Após ubiquitinação, a TP53 e o MDM2 são guiados para o proteossoma onde são degradados. Quando o MDM2 se encontra ubiquitinado, a estabilidade da TP53 aumenta assim como a sua meia-vida, de minutos para horas.[25][26][27]

A p14^{ARF}, um dos produtos do locus do CDKN2A liga-se ao MDM2, promovendo a sua degradação e, em consequência, prevenindo a ubiquitinação da p53 e a sua. A p14^{ARF} é regulada negativamente pela TP53. Por outro lado, o MDM4 também regula a atividade da TP53 (Fig. 3). Logo, a perda da função normal da TP53 pode resultar de alterações nos TP53, MDM2, MDM4, ou p14^{ARF}. [10][15]

Esta via encontra-se alterada em 87% dos casos do GBM (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008), essas alterações provêm essencialmente de mutações ou de deleções homozigóticas do gene TP53 (35%), do CDKN2A/p14^{ARF} (49%), amplificação de MDM2 (14%) ou do MDM4 (7%) (TGCA 2008). As mutações no TP53 são mais frequentes nos GBMs secundários do que nos primários (65% vs 28%). Das mutações do TP53 nos GBMs secundários, 57% estão presentes nos codões 248 e 273, enquanto nos GBMs primários apresentavam uma distribuição mais aleatória. Além disso, uma metilação do promotor do CDKN2A é frequente nos GBMs, levando a uma perda da expressão de p14^{ARF}. [10][15]

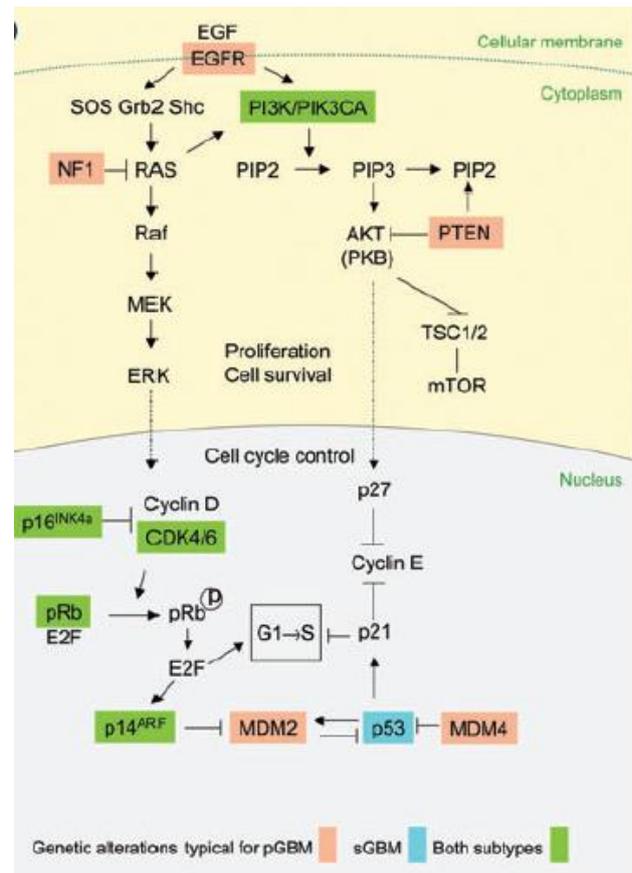


Fig. 3. Vias de sinalização major envolvidas na patogênese dos GBMs. Adaptado. [15]

4.9 Via EGFR/RAS/NF1/PTEN/PI3K

Cerca de dois terços dos glioblastomas primários e um terço dos glioblastomas secundários exibem alterações em pelo menos num dos seguintes genes: EGFR, PTEN, ou PIK3CA. Recetores para fatores de crescimento (como os EGFR e PDGFRA) tornam-se ativos pela ligação do seu respetivo ligando (EGF, TFG- α , PDGF) aos seus domínios extracelulares, ocorrendo a dimerização do recetor. Estes recetores ativam uma variedade de eventos de transdução de sinal mediada por fosforilação intracelular. A nível da biologia dos gliomas, os eventos de maior relevo são o recrutamento da cinase-3 do fosfatidilinositol (PI3K) para a membrana celular ou a ativação da RAS. [5]

O complexo PI3K é composto por uma proteína com atividade catalítica, a p110 α (codificada pelo PIK3CA) e por uma proteína reguladora, a p85 α (codificada pelo PIK3R1). A PI3K fosforila o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) ao respetivo fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP₃), que por sua vez vai ativar moléculas responsáveis por uma reação em

cascata, tais como a proteína cinase B (AKT) e a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). Tal cascata de eventos vai conduzir à proliferação celular e aumento da sobrevivência celular devido à inibição da apoptose. A PTEN inibe o sinal da PIP₃, inibindo a proliferação celular. A PI3K também pode ser ativada pela p21 dependente da RAS ou pela p21 independente da RAS.[14][28]

As alterações genéticas induzem uma ativação da PI3K por diferentes mecanismos:

- Mutação ou deleção homocigótica de três genes supressores de tumor: Neurofibromina 1 (NF1), que controla a RAS (alterado em 18% GBMs), PTEN (alterado em 36% dos GBMs) e o PIK3RI (15%);

- Mutação ou amplificação dos recetores dos fatores de crescimento (EGFR 45%, PDGFRA 13%), mutação ativadora de PI3KCA ou amplificação da AKT (2%).

As alterações da PI3K desempenham um papel oncogénico major na desregulação da transcrição de inúmeros genes.[10][15]

A amplificação do gene do EGFR, um membro da família dos recetores tirosina-cinase, ocorre aproximadamente em 40% do glioblastomas primários, mas raramente ocorre nos glioblastomas secundários. A amplificação do EGFR está normalmente associada a mutações por deleção, EGFRvIII (deleção dos exões 2-7) é o tipo mais comum. Esta forma mutada exibe uma ativação constitutiva do recetor, não é afetada pelo mecanismo regulação negativa do recetor, exercendo efeitos mitogénicos.[13][29]

O gene PTEN apresenta-se mutado em 15-40% dos glioblastomas primários, mas raramente nos secundários. As mutações e amplificações do complexo PIK3CA são raras em ambos os tipos de glioblastoma. Dados fornecidos pelo Cancer Genome Atlas Research Network (2008), em que se estudou principalmente GBMs primários, mostraram uma alteração na via EGFR/RAS/NF1/PTEN/PI3K em 88% dos GBMs.[10][15]

4.10 Via p16^{INK4a}/CDK4/RBI

Proteína do Retinoblastoma (pRB) controla o ciclo celular na transição da fase G1 para a fase S, tratando-se de uma complexa cascata de eventos envolvendo muitos fatores moleculares. O efetor final desta via são os fatores de transcrição da família E2F, que agem como mitogénios tendo como alvo as proteínas envolvidas na replicação do DNA. A pRB complexa com as E2Fs e inibe a sua função. O complexo CDK4/ciclina D1 fosforila a pRB e liberta as E2Fs que ativam genes envolvidos na transição de fases (G1 para S). A p16^{INK4a}, codificada pelo CDKN2A, vai ligar-se ao CDK4, inibindo o complexo, que por sua vez vai inibir a transição de fases.[15][17]

Logo, a perda de função da pRB leva a um aumento dos níveis da E2F, assim como uma fosforilação anormal aumentada da pRB. Os níveis elevados de E2F vão induzir uma proliferação celular. Essa perda de função pode resultar da alteração da expressão de qualquer um dos seguintes genes: p16^{INK4a}, CDK4, RBI.[16]

Aproximadamente 80% dos glioblastomas contêm uma ou mais aberrações genéticas nesta via. Apesar de só 20% dos GBMs apresentarem mutações no locus RB, mutações que levam à inativação do regulador “upstream”, p16^{INK4a}, ou mutações que originam a ativação de fatores “downstream”, CDK4 ou ciclina D, que resultam num controlo desregulado do fator de transcrição E2F1, são muito comuns. Adicionalmente, a metilação do promotor do gene RBI é 43% mais prevalente no GBM secundário comparado com tumores primários. Contudo, não é encontrado em astrocitomas anaplásticos ou de baixo grau, corroborando a ideia de que poderá ser um acontecimento tardio na progressão do astrocitoma.[14][30]

5. Mecanismos associados à neovascularização

A vascularização dos cancros no ser humano, incluindo tumores cerebrais, é um processo complexo que envolve co-opção, angioblastos, microambiente tumoral e mimetismo vasculogénico. O GBM é conhecido por ter vasos sanguíneos com um diâmetro alargado e apresentar uma permeabilidade elevada, membranas basais espessas e células endoteliais altamente proliferativas. Um dos critérios de avaliação da malignidade é a proliferação neoplástica elevada das células da glia paralelas à proliferação vascular endotelial. A densidade vascular no GBM é mais elevada do que em gliomas de grau inferior. Um aumento na vascularização vai piorar significativamente o prognóstico da doença.[31]

Foram observados, em estudos histopatológicos, aglomerados de células de glioma que se localizavam em redor de vasos recém-desenvolvidos no parênquima normal adjacente até às margens do tumor. Infiltrações de células isoladas também foram observadas no parênquima cerebral normal independentemente da vasculatura. Estes diferentes fenótipos, invasivo e angiogénico, podem ser dependentes da angiogénese ou independentes desta, gerando uma mistura de subclones com diferentes fenótipos em várias proporções.[32]

5.1 Vasos sanguíneos tumorais

Os vasos sanguíneos nos GBMs são diferentes, morfológica e funcionalmente, dos vasos normais. Num cérebro normal a vasculatura dos capilares consiste nas células endoteliais, pericitos, astrócitos e membrana basal, que em conjunto formam a barreira hematoencefálica (BHE). A função da BHE é conservada por vários mecanismos, incluindo as

junções oclusivas entre as células endoteliais, que previnem a entrada paracelular de substâncias no cérebro, os mecanismos de transporte ativo e as bombas de efluxo, como as glicoproteínas-P presentes nas células endoteliais. Em contraste com a estrutura vascular altamente organizada encontrada num cérebro normal, os vasos tumorais no GBM são tortuosos, desorganizados e altamente permeáveis. Além destas características, ainda apresentam paredes endoteliais, membrana basal e um revestimento de pericitos anormais, resultando na perda da integridade da BHE. A BHE comprometida leva a um edema cerebral, que muitas vezes provoca sintomas sérios nos pacientes. As células tumorais que produzem VEGF contribuem significativamente para este processo devido ao aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos. Contudo, contrastando com o centro do tumor, a BHE permanece funcional perto das extremidades infiltrativas do tumor, o que torna a entrega de fármacos a estas zonas um desafio.[33]

5.2 Angiogénese no GBM

Temporariamente, a co-opção vascular é o primeiro mecanismo pelo qual os gliomas alcançam a sua vasculatura. As células do glioma, numa fase inicial, acumulam-se em redor dos vasos sanguíneos já existentes e vão “descolar” os pés terminais dos astrócitos levando à rutura do contacto normal entre as células endoteliais e a membrana basal. As células endoteliais afetadas vão expressar angiopoietina-2 (Ang-2), que na ausência de VEGF vão ter como consequência a apoptose celular, a destabilização e o colapso da parede do vaso, e a diminuição do revestimento por pericitos.[33][34]

Seguidamente, a população das células tumorais migram ativamente da região hipóxica central, originando pseudopaliçadas. As células hipóxicas, envolvendo zonas necróticas, estimulam a expressão de VEGF e outros fatores proangiogénicos como a IL-8, que levam à hiperplasia das células endoteliais que expressam VEGFR-1 e -2, e à origem da hiperplasia com regiões de corpos glomerulóides. Alterações genéticas, como as mutações da p53, aumentam a resistência das células tumorais sob condições de stress hipóxico, as células não sofrem morte apoptótica, apesar da privação de oxigénio, contribuindo para a indução da expressão do VEGF.[35]

A expressão de angiopoietina assemelha-se ao fenótipo angiogénico dos GBMs. Ang-1 e -2 são fatores de crescimento endotelial importantes que se ligam aos recetores tirosina-cinase (RTK) expressados nas células endoteliais. No cérebro normal, a Ang-1 regula a angiogénese induzida pelo VEGF pela ligação ao Tie2, que através do recrutamento dos pericitos leva à estabilização da vasculatura. Por outro lado, a Ang-2 pode agir como um antagonista da fosforilação do Tie2 pela Ang-1 e levar à regressão dos vasos sanguíneos.

Além disso, a Ang-2 promove a destabilização dos vasos na presença de VEGF, permitindo que a neovascularização ocorra. A Ang-1 é detetada na periferia do tumor onde controla o processo angiogénico com a Ang-2 e encontra-se absente na região peri-necrose, uma vez que a hipóxia diminui a expressão de Ang-1. A Ang-2 é altamente expressa nas duas regiões em torno da necrose, conduzindo à regressão vascular e, na periferia do tumor, participando na neovascularização com o VEGF.[34]

A hipóxia dos tecidos é o ativador mais potente dos mecanismos angiogénicos nos tumores cerebrais. O fator mais importante na angiogénese induzida pela hipóxia o fator indutor de hipóxia (HIF-1), que consiste num heterodímero de duas subunidades, a HIF-1 α e a HIF-1 β . Em condições normais de oxigénio o HIF-1 α encontra-se no estado ubiquitinado e sofre conseqüente degradação. Já durante a hipóxia esta subunidade liga-se à subunidade β formando o HIF-1 no núcleo celular, ligando-se na região promotora de genes onde estão presentes os elementos de resposta à hipóxia (HREs). Estes vão induzir a transcrição de mais de 100 genes que ajudam na adaptação celular a condições de baixos níveis de oxigénio. O VEGF é um dos genes em que o aumento de expressão é induzido pelo VEGF. Como já referido, o VEGF regula os edemas cerebrais circundantes dos tumores cerebrais e a formação de vasos sanguíneos. Mais especificamente, a expressão do VEGF-A encontra-se aumentada no GBM. O VEGF-A vai regular a sobrevivência, a permeabilidade, a proliferação e a migração das células endoteliais via VEGFR2.[34]

O HIF-1 ativa também metaloproteinases da matriz (MMPs), que degradam a membrana basal e a matriz extracelular, consistindo num processo que promove a invasão das células endoteliais. A hipóxia induz a expressão da MMP-2 e MMP-9 nas células tumorais e nas células endoteliais. Os níveis de expressão destas MMPs estão correlacionados com o grau histológico dos gliomas. Para além dos VEGFRs, e das MMPs, o HIF-1 ativa o inibidor do ativador do plasminogénio, dos fatores de transformação do crescimento (TGFs) α e β , de angiopoietinas e recetores Tie, de endotelina-1, da óxido nítrico-sintase indutível, de adrenomedulina, de eritropoietina e outros fatores, desempenhando todos eles um papel na angiogénese.[32][35]

Adicionalmente, a hipóxia aumenta a expressão do fator de inibição da migração de macrófagos (MIF), esta citocina é libertada após a estimulação hipotálamo-pituitária pelos leucócitos e uma variedade de outras células. O MIF promove a angiogénese, age como um imunossupressor e permite ultrapassar o controlo do crescimento celular mediado pela p53, existindo uma correlação entre a sua expressão e o VEGF nos GBMs. Durante hipóxia severa também ocorre uma redução na produção e atividade da hialuronidase. Existem gliomas em ambientes ricos em hialuronano que expressam elevados níveis do recetor

CD44 que liga elementos da matriz extracelular, incluindo o hialuronano. A sinalização desencadeada pelo CD44 *intracellular domain* (ICD) *fragment* promove a migração e invasão celular. Assim as hialuronidases poderão desempenhar uma função na angiogénese dos gliomas.[35]

No processo de “brotação” e ramificação, a aquisição dos fenótipos de célula de ponta e *stalk cell* entre as células endoteliais expostas à estimulação proangiogénica envolve a via delta-like 4 (DLL-4)/Notch. Esta via de sinalização consiste em quatro isoformas do recetor Notch, em que os Notch1 e Notch4 estão expressos nas células endoteliais, mas o Notch1 parece ser o mais importante no desenvolvimento da angiogénese. O ligando delta-like 4 (DLL-4) será o de maior relevo na estimulação da angiogénese, onde outro ligando, Jagged1, compete com o DLL-4 pelo mesmo recetor, regulando negativamente a angiogénese. VEGF-A induz a sinalização nos VEGFR-2 e -3, que estão expressos nas células de ponta levando ao aumento da expressão do DLL-4 e subsequente ativação da sinalização Notch em células endoteliais *stalk* adjacentes. Uma vez ativada, esta via vai proporcionar um feedback negativo à sinalização do VEGFR pelo aumento da expressão do VEGFR-1 mas inibindo a expressão dos VEGFR-2 e -3 nas células *stalk*. Este circuito fornece uma maneira de regular o destino celular das células de ponta contras as células *stalk*. Esse aumento de expressão de VEGFR-1, que age como um indutor, contribui para a manutenção do gradiente de VEGF. Bloqueando a interação DLL4-Notch que leva a tumores hipervascularizados que no entanto são inibidos no seu crescimento, fenómeno designado de “paradoxo delta” que é provavelmente baseado na produção excessiva de vasos não funcionais. Recentemente, tem-se observado que a efrina-B2 regula as células de ponta mediadas pelo VEGF durante a angiogénese, o que é uma função semelhante à que exerce na orientação axonal. A expressão frequente do DLL4, nas células endoteliais dos vasos tumorais, está correlacionada com gliomas de grau elevado. [36][37]

Os estádios finais da angiogénese dizem respeito à morfogénese capilar, mediada maioritariamente pelas integrinas $\alpha_3\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ assim como pelo CD44. As células endoteliais ativadas vão secretar PDGF, que resulta no recrutamento de pericitos para o vaso recém-formado, auxiliado pela via Ang/Tie. O feedback negativo por fatores antiangiogénicos endógenos, como também a acumulação de matriz extracelular, podem interferir no processo de modelação vascular.[34]

5.2.1 Angiogénese independente de hipóxia

Apesar de ter sido provado que a hipóxia tem um papel crítico na angiogénese dos gliomas, existem provas que também indicam a existência de mecanismos independentes da hipóxia. A proliferação vascular pode ocorrer perto da extremidade invasora do GBM, muitas vezes remota do núcleo necrótico e hipóxico central do tumor.

Por exemplo, usando tecido humano congelado, conseguiu-se mostrar que vários tipos de tumores apresentavam a expressão de VEGF-A aumentada na ausência de marcadores de hipóxia. Mecanismos da estabilização do HIF-1 independentes da hipóxia também foram demonstrados. Por exemplo, várias mutações genéticas (incluindo genes mutados que codificavam PDGFR, EGFR, p53, RBI, VHL e PTEN) exibiram resultados na estabilização do HIF-1 α , resultando no aumento da angiogénese devido ao aumento de expressão de fatores angiogénicos. Algumas destas mutações, como já descrito anteriormente, estão implicadas nos gliomas.[34]

5.3 Vasculogénese

A vasculogénese derivada da medula óssea descreve o recrutamento das células progenitoras endoteliais (EPCs), também designadas como angioblastos ou células derivadas da medula óssea, circulantes para o tumor, a sua integração na parede do vaso e a sua diferenciação terminal para uma célula endotelial. Este fenómeno tem atraído muita atenção devido ao dogma precedente que a vasculatura pós-natal (sob ambas as condições fisiológicas e patológicas) só pode ocorrer pela via da angiogénese e não pela vasculogénese de modo a adaptar-se à alteração das necessidades fisiológicas. A vasculogénese é o processo pelo qual os vasos sanguíneos são formados *de novo* pela diferenciação *in situ* dos progenitores primitivos (por exemplo angioblastos) em células endoteliais maduras.[38]

Estudos prévios em animais associados à vasculogénese tumoral originaram dados contraditórios. Apesar de alguns destes apontarem para a vasculogénese como um fator significativo para a formação de novos vasos tumorais, outros não. Estudos moleculares em ratos, que utilizaram ratos quiméricos com células derivadas da medula óssea marcadas com proteína verde fluorescente (GFP), juntamente com técnicas de imagem confocal de alta resolução e de reconstrução 3D, revelaram que apesar de células endoteliais derivadas da medula estarem presentes em gliomas experimentais representam apenas uma pequena porção (inferior a 1%) de todas as células endoteliais vasculares.[39]

Contudo, é sugerido que a vasculogénese é importante para a neovascularização depois da irradiação do tumor. Por exemplo, noutro estudo [40] onde as células da medula óssea de ratos marcadas com β -actina-GFP (EGFP) foram transplantadas para ratos

deficientes em Rag-1 que foram letalmente irradiados. Subsequentemente, os astrócitos HIF-1 α competentes (GBM normal) ou deficientes (GBM “*knock out*” HIF) dos ratos transformados foram implantados intracranialmente. Sendo que, os ratos implantados com as células de GBM normal HIF-1 α competentes apresentaram até 20% de células GFP+, enquanto apenas um terço deste número foi encontrado nos ratos com células de GBM *knock out* HIF. Indo de encontro a outros estudos que mostraram que nos gliomas intracranianos que a secreção de CXCL12 induzida pela hipóxia é suficiente para a enxertia das células progenitoras derivadas da medula óssea nos vasos sanguíneos tumorais.[40]

Novamente, este problema levantou uma controvérsia entre laboratórios, onde uns sugeriam a incorporação direta das células derivadas da medula óssea na vasculatura tumoral no processo da vasculogênese, e outros apontavam para um papel mais de suporte. Assim, o mecanismo exato do mecanismo de contribuição de EPCs para a neovascularização dos tumores cerebrais ainda não se encontra completamente elucidado.[37]

5.4 Mecanismos alternativos da neovascularização

5.4.1 Mimetismo vasculogénico

O mimetismo vasculogénico é definido como um processo onde as células estaminais cancerígenas podem diferenciar-se em células endoteliais (Fig. 4), e foi primeiramente descrito em modelos de melanoma humano. Evidências de mimetismo vascular presente em gliomas foram publicadas por Yue and Chen[41], onde demonstraram a presença de mimetismo vascular em 2/45 das amostras de astrocitomas humanos. Apesar dos vasos revestidos por endotélio dominarem a microvasculatura, um padrão vascular de PAS-positivo e desprovido de CD34+ contendo glóbulos vermelhos foi identificado em dois astrocitomas de grau IV. Contudo, o uso de PAS como marcador para o fenótipo das células endoteliais é questionável, visto as células do glioma serem descritas por expressar PAS.[41]

Outro estudo[42] sugeriu uma ligação entre o mimetismo vascular nos GBMs e resistência à radioterapia. Usando um sistema de cocultura organotípica tridimensional de células de glioma transfectadas com GFP e células endoteliais com marcadas com corante vermelho vital, mostraram que as células endoteliais formavam estruturas vasculares primeiro, seguidas da incorporação das células do glioma num espaço de 48 horas, criando um rede vascular em mosaico. Sob condições angiogénicas, as células do glioma formavam redes vasculares tridimensionais, mas as células do glioma não revelavam marcadores endoteliais específicos, sugerindo o mimetismo vascular. Contudo, a expressão diminuída de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), nas células do glioma, e o aumento da expressão de

CD133, indicam uma mudança para um fenótipo de célula estaminal. A presença de células de glioma, *in vitro*, não só estabilizavam as estruturas vasculares, como também conferiam resistência à radioterapia.[42]

Recentemente, foi avaliada a relação entre o mimetismo vasculogénico e as características clínicas de 101 pacientes com glioma.[43] A sobrevivência dos pacientes com presença de mimetismo vasculogénico era inferior comparada com os pacientes que não apresentavam mimetismo, encontrando-se uma correlação entre o grau tumoral definido pela OMS e o mimetismo

vascular. O mais peculiar neste estudo foi a particularidade de que os tumores que exibiam mimetismo apresentavam uma menor densidade vascular do que os que não exibiam mimetismo, indicando que o mimetismo vascular fornece uma via de neovascularização alternativa.[43]

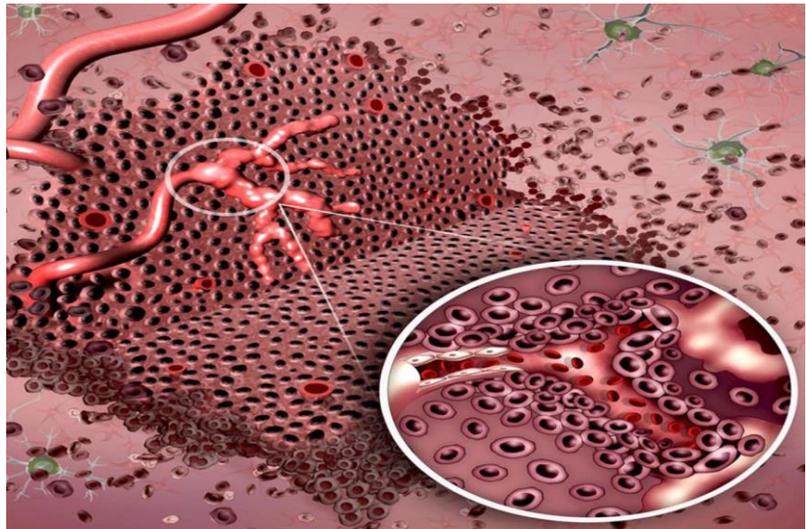


Fig. 4. Mimetismo vascular, capacidade das células tumorais de formar uma espécie de rede funcional de vasos sanguíneos. Adaptado. [34]

5.4.2 Transdiferenciação das células cancerígenas em células endoteliais

O mais recente mecanismo descrito na neovascularização do glioma envolve a transdiferenciação das células do glioma para um fenótipo endotelial (Fig. 5). Um conceito em que o microambiente das células estaminais cancerígenas fornece um ambiente ideal para a auto-renovação e manutenção dessas, estimulando as vias de sinalização das células estaminais cancerígenas e levando à secreção de fatores que promovem a angiogénese. Para o glioblastoma, estas células têm sido descritas como promotoras da angiogénese tumoral enquanto são submetidas a quimioterapia e radioterapia. Mais especificamente, as células estaminais do glioma têm mostrado afetar a angiogénese e a vasculogénese pelo aumento da expressão de VEGF e SDF1. Em relação ao glioblastoma, pensa-se que surge do microambiente perivascular das células estaminais cancerígenas. A transdiferenciação das células estaminais cancerígenas é atualmente considerada um tipo de formação de vasos tumorais. A grande diferença entre este mecanismo e o anterior é que neste estas células vão fazer parte da vasculatura pré-existente, apresentando o mesmo fenótipo e expressão

de marcadores específicos das células endoteliais, já o mimetismo vascular trata-se da capacidade das células tumorais criarem uma “espécie” de rede vascular funcional.[34][36]

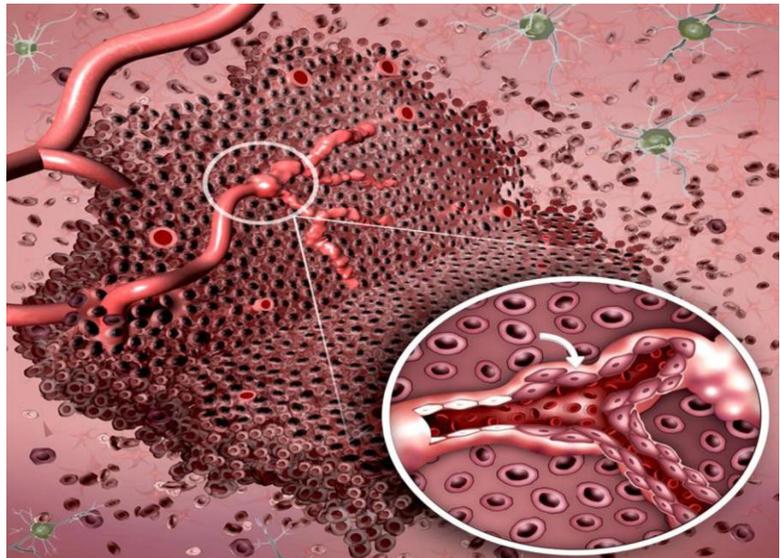


Fig.5. Transdiferenciação das células cancerígenas em células endoteliais, mecanismo da neovascularização do glioma que envolve a transdiferenciação das células do glioma em células endoteliais revestindo os canais vasculares. Adaptado. [34]

6. Compreensão da farmacoterapia no GBM

Qualquer terapia eficaz contra o cancro tem de conseguir chegar ao seu alvo e exercer o seu efeito com um perfil de toxicidade aceitável. O SNC, devido à sua complexidade anatómica, à diferenciação terminal das células nervosas, ao seu baixo potencial de auto-reparação e ao isolamento anatómico e fisiológico, apresenta um desafio distinto. Os cirurgiões estão limitados na sua capacidade de atingir a cura devido à natureza infiltrativa do GBM e às restrições dadas pelo local do tumor. Muitos estudos retro- e prospetivos apoiam que a realização da ressecção máxima não vai alterar a morbidade.[44]

No princípio, a energia da radiação é capaz de alcançar o seu alvo ao nível cerebral e exercer os seus efeitos anti-tumorais. Na verdade, a tolerância do tecido normal limita, potencialmente, as doses curáveis e uma variedade de fatores intrínsecos ao GBM poderão torná-los relativamente radorresistentes. Muitas tentativas foram efetuadas com o objetivo de identificar radioprotetores do tecido cerebral normal e radiosensibilizadores específicos do tumor para o GBM, mas até à data não têm tido grande sucesso.[45]

Esforços para tratar o GBM com quimioterapia são limitados pela BHE, devido à sua natureza anatómica e fisiológica. Drogas lipofílicas de carga neutra e de baixo peso molecular penetram o cérebro de forma mais eficaz. Contudo, o endotélio cerebral contém altas concentrações de transportadores de efluxo pertencendo à família ABC (ATP-binding cassette), sendo a mais notável a glicoproteína-P. Isto vai limitar a penetração do fármaco no SNC. Como resultado, uma variedade de técnicas estão a ser desenvolvidas de modo a aumentar a de fármacos aos tumores cerebrais. O tratamento mais comum nos GBMs

recém-diagnosticados começa então com a ressecção cirúrgica do tumor e, a partir desse processo, os pacientes vão ser sujeitos a radioterapia, recebendo concomitantemente TMZ, seguido da terapia de TMZ adjuvante.[44]

6.1 Nitrosoureas

As nitrosoureas são agentes alquilantes com um longo historial no tratamento cancerígeno. As cloro-etil-nitrosoureas (CENUs), como a lomustina, a nimustina, a semustina, a carmustina e a fotemustina são usadas no tratamento de gliomas malignos e em metástases cerebrais de diferentes origens. Estes fármacos alquilam as bases de DNA e levam à formação de monoadutos e subsequentemente “*crosslinks*” entre as cadeias. Esses *crosslinks* são lesões críticas no DNA bloqueando a replicação e transcrição do DNA, resultando na inibição da progressão da fase S. Em consequência as células são ativadas para sofrer apoptose e necrose, ambos os processos contribuindo para a eficácia da terapia cancerígena com CENUs. Porém, as células tumorais resistem à quimioterapia através da reparação do dano no DNA causado pelas CENUs. A enzima suicida MGMT remove a lesão precursora, O⁶-cloro-etil-guanina, antes da sua conversão em *crosslinks* entre as cadeias. Em células com déficit de MGMT, os *crosslinks* formados ativam redes enzimáticas complexas para a sua remoção.[46][47]

6.2 Temozolomida (TMZ)

A Temozolomida é a quimioterapia mais usada e eficaz na quimioterapia para o GBM, tendo sido desenvolvida nos anos 80 com a intenção de tratar as metástases cerebrais do melanoma. As propriedades farmacocinéticas da TMZ são a rápida absorção oral, a conversão espontânea para o metabolito ativo MTIC, tropismo para ambientes básicos e uma boa biodisponibilidade com um bom perfil tóxico-terapêutico. Trata-se de um agente metilante que vai metilar o DNA, levando à quebra da dupla cadeia, causando a paragem do ciclo celular e por último a morte celular (semelhante às nitrosoureas). Porém, devido à sua meia-vida curta, a TMZ tem de ser administrada em altas doses, e a administração sistémica prolongada resultou numa série de efeitos secundários. De modo a melhorar a eficácia da TMZ e reduzir os efeitos secundários da quimioterapia, a administração sistémica da TMZ utilizando transportadores biodegradáveis tais como nanopartículas é amplamente estudada.[48]

A adição da TMZ à cirurgia e radioterapia estende a sobrevivência média para vários meses. O benefício da TMZ é claramente superior em pacientes com baixos níveis da proteína reparadora de DNA, MGMT, no seu tumor uma vez MGMT remove os grupos

metil de posição O-6 da guanina, diminuindo assim a eficácia da TMZ. Programas alternativos de administração da TMZ foram desenvolvidos de modo a aumentar a intensidade da dose, com o propósito de ultrapassar a resistência à TMZ. Os programas alternativos eram: uma dose baixa de administração contínua (50mg/m² diariamente), 1 semana de administração/ 1 semana de pausa (150mg/m² por 7 dias, a cada 14 dias), e 3 semanas de administração/ 1 semana de pausa (75-100mg/m² por 21 dias, a cada 28 dias). A 105 pacientes com GBM com a primeira ocorrência a suceder-se, pelo menos, nos primeiros 3 meses depois do término da radioterapia foram aleatoriamente distribuídos em 2 programas diferentes de administração da TMZ: 1 semana de administração (120mg/m² por dia) /1 semana de pausa ou 3 semanas de administração (80mg/m² por dia) /1 semana de pausa. Os resultados foram idênticos em relação ao tempo médio para a falha do tratamento (1.8 vs 2. meses) e para a sobrevivência global (9.8 vs 10.6 meses), não havendo diferenças entre os dois regimes de dosagem em relação à eficácia, à segurança ou à tolerabilidade. O resultado mais importante foi o forte papel no prognóstico do estado de metilação do promotor do MGMT em pacientes com a readministração de TMZ, sendo a sobrevivência sem progressão a 6 meses de 39.7% em pacientes com MGMT metilado contra 6.9% em pacientes sem a metilação do promotor do MGMT.[49]

6.3 EGFR como alvo terapêutico

O EGFR e as suas vias de sinalização representam fatores-chave na oncogênese. Duas classes de terapia têm vindo a ser desenvolvidas, tendo como alvo terapêutico o EGFR. A primeira classe terapêutica inclui os anticorpos monoclonais humanizados contra o domínio extracelular do EGFR, concebidos para bloquear o local de ligação ou mediar a sua desregulação. A segunda classe inclui os inibidores da atividade tirosina cinase (TKIs). Os TKIs são miméticos da adenosina trifosfato (ATP) que ligam ao bolso de ligação da cinase, o que exclui a ligação do ATP prevenindo a transdução do sinal. Exemplos de anticorpos monoclonais EGFR aprovados pela FDA são o Cetuximab e o Panitumumab, já em relação aos TKIs estão incluídos o Erlotinib, Gefitinib e o Laptinib, sendo este último um inibidor duplo de EGFR/HER2.

Apenas um estudo de fase II foi realizado com TKIs tendo como alvo EGFR em pacientes com reincidência de GBM. Neste estudo, não se observou atividade significativa por parte do erlotinib.

Outros TKIs também foram testados em estudos aleatórios, tais como o cediranib ou o enzastaurin direcionados contra a proteína cinase C e a via PI3K/AKT, usados

isoladamente ou em combinação com quimioterapia, não demonstraram diferenças na atividade comparados com a Lomustina.[46]

Devido à mutação comum do glioblastoma, EGFRvIII, os tratamentos aprovados que têm o EGFR como alvo não mostram resultados de eficácia. Terapias alternativas com o alvo terapêutico sendo o EGFRvIII têm sido desenvolvidas, incluindo a vacina Rindopepimut e o anticorpo monoclonal mAb806. O primeiro não passou da fase III nos ensaios clínicos e foi descontinuado, já o segundo passou a fase I e uma conjugação entre fármaco e anticorpo monoclonal baseado nesse, designado ABT-414 passou a fase II.[29]

6.4 Bevacizumab

Várias abordagens tendo como alvo a neovasculatura foram propostas. Foram descritos altos níveis de VEGF no plasma e no fluido tumoral dos pacientes com GBM, e a sobreexpressão de VEGF foi já correlacionada com o prognóstico do GBM. Assim, dentro dos numerosos alvos terapêuticos identificados, a via de sinalização do VEGF tem sido o alvo de diferentes estratégias terapêuticas envolvendo quer o VEGF (bevacizumab anticorpo monoclonal anti-VEGF) ou os seus recetores. Até à data, a experiência clínica de maior extensão com terapia antiangiogénica nos gliomas foi com o bevacizumab. A terapia antiangiogénica com o bevacizumab tem-se tornado numa terapia padrão nos gliomas recorrentes de alto grau nos adultos.[32][50]

Vários estudos clínicos em pacientes com glioma apresentaram resultados, nos quais o bevacizumab combinado com a quimioterapia demonstrou atividade anti-tumoral com uma toxicidade aceitável.[51][52] Pacientes de várias localidades continuam o tratamento com o bevacizumab devido à melhoria na qualidade de vida, a um aumento da sobrevivência sem progressão e a uma diminuição da dependência de esteroides visto a diminuição do edema tumoral. [52] Como agente único em ensaios prospetivos do GBM recorrente, o bevacizumab demonstrou uma taxa de resposta radiológica de 28% para 35%, uma sobrevivência de 6 meses sem progressão média de 28% para 35%, e sobrevivência sem progressão média e sobrevivência no global de 3.7 para 4.2 meses e de 7.2 para 9.2 meses, respetivamente.[53]

Quando combinado com quimioterapia (irinotecano, temozolomida, etopósidos, ou ftemustina) para GBM recorrente, a taxa de resposta radiológica foi mais elevada (35% para 60%), com uma sobrevivência de 6 meses sem progressão média de 37% para 50%. Estudos recentes também avaliaram a viabilidade do bevacizumab combinado com radiação no tratamento do GBM recorrente, apresentando resultados promissores com toxicidades

aceitáveis. O tratamento inicial de pacientes recém-diagnosticados com GBM com o bevacizumab apresentou melhorias ao nível da sobrevivência sem progressão.[53]

7. Terapias emergentes

Devido à variedade de mutações que podem ocorrer nos GBMs, existem inúmeros alvos terapêuticos. Alguns, como referido, usados já na terapia do GBM. Mas, como expectável existe um número de terapias emergentes bastante elevado, onde muitas das quais ainda nem chegaram à fase de estudos clínicos. A seguir vão ser exploradas algumas delas.

7.1 Vírus Zika com atividade oncolítica contra as células estaminais do GBM

O vírus Zika (ZIKV) é um membro da família Flaviviridae, pertencendo aos vírus de RNA, que incluem o dengue, o vírus do Oeste do Nilo, e o vírus da febre amarela. O recente surto de microcefalia induzida pelo ZIKV aumentou extensão da pesquisa em relação ao seu tropismo celular. O ZIKV infeta o SNC em desenvolvimento, interferindo preferencialmente com as células estaminais neuronais e as células progenitoras. As células precursoras neuronais infetadas com ZIKV sofrem diferenciação, perda de proliferação e morte celular. Porém, os efeitos nos adultos são geralmente menos severos, com casos raros de meningoencefalite, sugerindo que a infeção por parte do ZIKV apresenta uma menor nocividade no cérebro adulto.

Num estudo recente[54], colocou-se a hipótese de usar o tropismo do ZIKV para as células precursoras contra o GBM. Para verificarem os efeitos do vírus no GBM, usaram células estaminais do GBM de um paciente que expressavam marcadores de células estaminais, auto-renovação, potencial de diferenciação, e que formavam tumores após xenotransplantação, assim como células diferenciadas de glioma. Selecionaram vários modelos de células estaminais do GBM e induziram a sua diferenciação através de exposição ao soro. Infetaram as células estaminais com as estirpes virais Africana e Americana do ZIKV. 7 dias depois, verificou-se a destruição das esferas.[54]

Este estudo demonstrou que nas primeiras 48 horas 60% das células foram infetadas por uma das estirpes, assim como a percentagem das células infetadas aumenta ao longo do tempo, consistente com a propagação do vírus. Também corroboram a ideia que o ZIKV pode infetar as células do glioma já diferenciadas mas a uma taxa inferior. De realçar analisar que a proliferação das células estaminais do GBM foi anulada por qualquer uma das estirpes do ZIKV, porém a proliferação das células diferenciadas do glioma não foi praticamente afetada. Os efeitos nas células estaminais em relação à contagem celular, à formação de

esferas e à proliferação, consistiram na diminuição destes parâmetros e o aumento da apoptose (medido pela atividade da caspase-3).[54]

As células estaminais do GBM muitas vezes apresentam resistência à quimioterapia, incluindo a terapia padrão da TMZ. Por isso, no mesmo estudo avaliaram a eficácia da combinação de TMZ com uma estirpe mutante do ZIKV. Embora a terapia isolada com o TMZ tenha demonstrado limitações em relação às células estaminais do GBM, a terapia combinada durante uma semana apresentou melhores resultados na eficácia anti-tumoral e na indução da apoptose. Os resultados deste estudo sugerem que as estirpes mutantes do ZIKV criadas artificialmente promovem a infeção e a lise das células estaminais do GBM com uma menor toxicidade às células neuronais diferenciadas próximas.[54]

7.2 Terapêutica no GBM dirigida à p53 mutante

Devido ao papel crítico desempenhado pela p53 numa série de cancros, foram desenvolvidas uma variedade de abordagens tendo como alvo a p53 e as suas vias de sinalização alteradas. Essas abordagens incluem a transfecção da p53 selvagem em tumores com mutações da p53 mediada por adenovírus, a utilização de pequenas moléculas para reativar a p53 mutada, e bloquear a degradação da p53 pelo proteossoma mediada pelo MDM2.[55]

A transfecção de p53 selvagem em ordem a normalizar a função dos tumores contendo p53 mutada tem sido um objetivo da terapia génica já há muito tempo. Um estudo de fase I [56] usando transfecção de p53 intratumoral mediada por adenovírus em pacientes com glioma malignos demonstrou que o tratamento induziu apoptose, aumento da expressão da p21, e toxicidade mínima. A sobrevivência sem progressão foi de 13 semanas, e a sobrevivência global foi de 43 semanas. Contudo, a distribuição da p53 não se dispersou na massa tumoral, resultando na expressão de p53 selvagem em algumas células tumorais, que poderia ter influenciado a sobrevivência. Outro estudo utilizando adenovírus com a replicação condicionada, ou seja, só se replicam nas células com a p53 disfuncional, mostraram eficácia em gliomas malignos. Neste estudo, o tempo médio até à progressão depois do tratamento com o adenovírus foi de 46 dias enquanto a sobrevivência média foi de 6.2 meses com 3 pacientes vivos aos 19 meses.[56]

Pequenas moléculas inibidoras e inibidores peptídicos da p53 e a sua via de sinalização têm sido alvos de estudo, numa variedade de tumores, incluindo o GBM. Vários compostos desenvolvidos para restaurar a função da p53 selvagem incluem: PRIMA-1 (reativação da p53 e indução de apoptose massiva-1), MIRA-3 (reativação da p53 mutada e indução de apoptose rápida), e STIMA-1 (grupo SH como alvo e indução da apoptose massiva). Estes compostos

ligam-se ao domínio de ligação ao DNA nas moléculas p53 mutadas de classe I de modo a restaurar a ligação ao DNA específica da p53, exibindo resultados anti-tumorais numa variedade de tipos de células.[57]

O *screening* de bibliotecas de pequenas moléculas levou à descoberta de vários compostos estabilizadores da p53. Estes agentes ligam-se à p53 mutante, estabilizam a sua função e restauram as características da p53 selvagem, como a paragem do ciclo celular e apoptose. Por outro lado, procuraram-se também pequenas moléculas que quebrassem a ligação p53-MDM2 ou p53-MDM4. Estes compostos previnem a inibição da p53 mediada pelo MDM2, de modo a restaurar as características da p53 selvagem.[58]

Apesar dos progressos com moléculas investigadas noutros modelos tumorais, o desenvolvimento de ensaios pré-clínicos e clínicos de tais compostos no GBM é limitado. Seria lógico observar progressos em protocolos experimentais com agentes usados noutros modelos tumorais a serem rapidamente investigados no GBM, devido à sua morbilidade e motilidade significativa.[55]

8. Conclusão

Nos últimos 10 anos, apesar de vários ensaios de fase III com compostos e conceitos anteriormente promissores, o progresso no tratamento dos pacientes com GBM tem sido pouco. Até à data, não tem sido acrescentado nenhum benefício ao tratamento padrão da radioquimioterapia com TMZ. A quimioterapia alquilante com TMZ usando o programa padrão mantém-se como a terapia de primeira linha de GBMs recém-diagnosticados. Ensaios de fase III com agentes antiangiogénicos, tais como o bevacizumab, o cediranib ou o enzastaurin apresentaram resultados negativos, apesar de exibirem dados promissores nos ensaios de fase II. Na reincidência, a readministração de TMZ, as nitrosoureas ou o bevacizumab quando disponíveis representam opções de terapia aceites.

A descoberta de vários marcadores moleculares tem, sem qualquer dúvida, auxiliado consideravelmente o entendimento da patologia molecular do GBM. Apesar de muitos desafios ainda estarem por ser cumpridos, estes numerosos avanços forneceram uma base para o desenvolvimento de regimes terapêuticos eficazes para vencer esta doença devastadora.

Assim sendo, existe uma necessidade urgente de incorporar os conceitos conhecidos dos biomarcadores na prática clínica de rotina que poderá assistir não só na seleção de pacientes, como também no ajustamento do programa terapêutico baseado na biologia específica do paciente. A maior barreira existente consiste na compreensão da heterogeneidade do GBM e na capacidade de trasladar as quantidades elevadas de dados pré-clínicos para uma escala superior.

9. Bibliografia

- [1] P. Thakkar *et al.*, “Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 23, pp. 1985–1996, Oct. (2014).
- [2] M. A. Hayat, Ed., *Tumors of the Central Nervous System, Volume 1*. Dordrecht: Springer Netherlands, (2011).
- [3] M. A. Hayat, *Tumors of the Central Nervous System, Volume 2*. Dordrecht: Springer Netherlands, (2011).
- [4] H.-G. Wirsching, E. Galanis, and M. Weller, “Glioblastoma,” vol. 134, pp. 381–397, (2016).
- [5] S. K. Ray, Ed., *Glioblastoma*. New York, NY: Springer New York, (2010).
- [6] H. Ohgaki *et al.*, “Genetic Pathways to Glioblastoma,” *Cancer Res.*, vol. 64, p. 6892, (2004).
- [7] Q. T. Ostrom *et al.*, “N E U R O - O N C O L O G Y CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006-2010,” *Neuro. Oncol.*, vol. 12, pp. 28–36, (2013).
- [8] D. Kita *et al.*, “Age as a predictive factor in glioblastomas: Population-based study,” *Neuroepidemiology*, vol. 33, pp. 17–22, (2009).
- [9] C. L. Appin and D. J. Brat, “Biomarker-driven diagnosis of diffuse gliomas,” *Mol. Aspects Med.*, pp. 1–10, (2015).
- [10] D. Figarella-Branger, C. Colin, A. Tchoghandjian, N. Baeza, and C. Bouvier, “Glioblastomes: Oncogenèse et bases biologiques,” *Neurochirurgie*, vol. 56, pp. 441–448, (2010).
- [11] M. R. Quigley, C. Post, and G. Ehrlich, “Some speculation on the origin of glioblastoma,” *Neurosurg. Rev.*, vol. 30, pp. 16–20, (2007).
- [12] H. Ohgaki and P. Kleihues, “Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas,” pp. 177–183, (2011).
- [13] M. Ranjit, K. Motomura, F. Ohka, T. Wakabayashi, and A. Natsume, “Applicable advances in the molecular pathology of glioblastoma,” *Brain Tumor Pathol.*, vol. 32, pp. 153–162, (2015).
- [14] K. Ludwig and H. I. Kornblum, “Molecular markers in glioma,” *J. Neurooncol.*, vol. 0, pp. 1–8, (2017).
- [15] H. Ohgaki and P. Kleihues, “Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas,” *Cancer Sci.*, vol. 100, pp. 2235–2241, (2009).
- [16] M. Preusser, C. Haberler, and J. A. Hainfellner, “Malignant glioma: Neuropathology

and neurobiology,” *Wiener Medizinische Wochenschrift*, vol. 156, pp. 332–337, (2006).

[17]K. Masui, T. F. Cloughesy, and P. S. Mischel, “Molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies,” *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, vol. 38, pp. 271–291, Jun. (2012).

[18]Q. J. Li, J. Q. Cai, and C. Y. Liu, “Evolving molecular genetics of glioblastoma,” *Chin. Med. J. (Engl.)*, vol. 129, pp. 464–471, (2016).

[19]R. J. Macaulay, “Impending Impact of Molecular Pathology on Classifying Adult Diffuse Gliomas,” vol. 22, (2015).

[20]H. Yan, W. Parsons, and G. Jin, “Mutations in Gliomas,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 360, pp. 765–773, (2009).

[21]M. Karsy, J. Guan, A. L. Cohen, R. L. Jensen, and H. Colman, “New Molecular Considerations for Glioma: IDH, ATRX, BRAF, TERT, H3 K27M,” *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, vol. 17, (2017).

[22]J. Schwartzenuber *et al.*, “Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma,” *Nature*, vol. 482, pp. 226–231, (2012).

[23]S. P. Ferris, J. W. Hofmann, D. A. Solomon, and A. Perry, “Characterization of gliomas: from morphology to molecules,” *Virchows Arch.*, pp. 1–13, (2017).

[24]H. Ohgaki *et al.*, “Genetic Pathways to Glioblastoma,” *Cancer Res.*, vol. 64, pp. 6892–6899, Oct. (2004).

[25]J. A. McCubrey *et al.*, “Roles of TP53 in determining therapeutic sensitivity, growth, cellular senescence, invasion and metastasis,” *Adv. Biol. Regul.*, vol. 63, pp. 32–48, (2017).

[26]B. England, T. Huang, and M. Karsy, “Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme,” (2013).

[27]S. Trino *et al.*, “P53-MDM2 pathway: Evidences for a new targeted therapeutic approach in B-acute lymphoblastic leukemia,” *Front. Pharmacol.*, vol. 7, pp. 1–7, (2016).

[28]H. Zhao *et al.*, “Recent advances in the use of PI3K inhibitors for glioblastoma multiforme: current preclinical and clinical development,” *Mol. Cancer*, vol. 16, p. 100, (2017).

[29]P. Wee and Z. Wang, “Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways,” *Cancers (Basel)*, vol. 9, pp. 1–45, (2017).

[30]S. Venkatesan, M. L. M. Lamfers, C. M. F. Dirven, and S. Leenstra, “Genetic biomarkers of drug response for small-molecule therapeutics targeting the RTK/Ras/PI3K, p53 or Rb pathway in glioblastoma,” *CNS Oncol.*, vol. 5, pp. 77–90, (2016).

[31]M. Zhang, G. Ye, J. Li, and Y. Wang, “Recent advance in molecular angiogenesis in glioblastoma: the challenge and hope for anti-angiogenic therapy,” *Brain Tumor Pathol.*, vol. 32, pp. 229–236, (2015).

[32]M. Onishi, K. Kurozumi, T. Ichikawa, and I. Date, “Mechanisms of Tumor Development and Anti-angiogenic Therapy in Glioblastoma Multiforme,” *Neurol Med Chir*, vol. 53, pp. 755–763, (2013).

[33]Y. Soda, C. Myskiw, A. Rommel, and I. M. Verma, “Mechanisms of neovascularization and resistance to anti-angiogenic therapies in glioblastoma multiforme,” *J. Mol. Med.*, vol. 91, pp. 439–448, (2013).

[34]M. E. Hardee and D. Zagzag, “Mechanisms of glioma-associated neovascularization,” *Am. J. Pathol.*, vol. 181, pp. 1126–1141, (2012).

[35]O. Kargiotis, J. S. Rao, and A. P. Kyritsis, “Mechanisms of angiogenesis in gliomas,” *J. Neurooncol.*, vol. 78, pp. 281–293, (2006).

[36]S. Takano, “Glioblastoma angiogenesis: VEGF resistance solutions and new strategies based on molecular mechanisms of tumor vessel formation,” *Brain Tumor Pathol.*, vol. 29, pp. 73–86, (2012).

[37]K. H. Plate, A. Scholz, and D. J. Dumont, “Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant gliomas revisited,” *Acta Neuropathol.*, vol. 124, pp. 763–775, (2012).

[38]A. S. Arbab, “Activation of alternative pathways of angiogenesis and involvement of stem cells following anti-angiogenesis treatment in glioma,” *Histol. Histopathol.*, vol. 27, pp. 549–57, (2012).

[39]M. R. Machein, S. Renninger, E. De Lima-hahn, and K. H. Plate, “Minor Contribution of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitors to the Vascularization of Murine Gliomas.”

[40]R. Du *et al.*, “HIF1 α Induces the Recruitment of Bone Marrow-Derived Vascular Modulatory Cells to Regulate Tumor Angiogenesis and Invasion,” *Cancer Cell*, vol. 13, pp. 206–220, Mar. (2008).

[41]W.-Y. Yue and Z.-P. Chen, “Does Vasculogenic Mimicry Exist in Astrocytoma?,” *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 53, pp. 997–1002, (2005).

[42]C. A. Shaifer, J. Huang, and P. C. Lin, “Glioblastoma cells incorporate into tumor vasculature and contribute to vascular radioresistance,” *Int. J. Cancer*, vol. 127, pp. 2063–2075, (2010).

[43]X. M. Liu *et al.*, “Clinical significance of vasculogenic mimicry in human gliomas,” *J. Neurooncol.*, vol. 105, pp. 173–179, (2011).

[44]M. K. Nicholas, R. V. Lukas, S. Chmura, B. Yamini, M. Lesniak, and P. Pytel, “Molecular heterogeneity in glioblastoma: Therapeutic opportunities and challenges,” *Semin. Oncol.*, vol. 38, pp. 243–253, (2011).

[45]S. Noda, A. El-Jawahri, D. Patel, T. Lautenschlaeger, M. Siedow, and A. Chakravarti, “Molecular Advances of Brain Tumors in Radiation Oncology,” *Semin. Radiat. Oncol.*, vol. 19,

pp. 171–178, (2009).

[46]A. Tosoni, E. Franceschi, R. Poggi, and A. A. Brandes, “Relapsed Glioblastoma: Treatment Strategies for Initial and Subsequent Recurrences,” *Curr. Treat. Options Oncol.*, vol. 17, (2016).

[47]T. Nikolova, W. P. Roos, O. H. Krämer, H. M. Strik, and B. Kaina, “Chloroethylating nitrosoureas in cancer therapy: DNA damage, repair and cell death signaling,” *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1868, pp. 29–39, (2017).

[48]C. Y. Lee, “Strategies of temozolomide in future glioblastoma treatment,” *Onco. Targets. Ther.*, vol. 10, pp. 265–270, (2017).

[49]M. Weller *et al.*, “MGMT promoter methylation is a strong prognostic biomarker for benefit from dose-intensified temozolomide rechallenge in progressive Glioblastoma: The DIRECTOR Trial,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 21, pp. 2057–2064, (2015).

[50]D. Khosla, “Concurrent therapy to enhance radiotherapeutic outcomes in glioblastoma,” *Ann. Transl. Med.*, vol. 4, p. 54, (2016).

[51]A. Narayana *et al.*, “Antiangiogenic therapy using bevacizumab in recurrent high-grade glioma: impact on local control and patient survival,” *J. Neurosurg.*, vol. 110, pp. 173–180, (2009).

[52]M. C. Chamberlain, “Bevacizumab for recurrent malignant gliomas: Efficacy, toxicity, and patterns of recurrence,” *Neurology*, vol. 72, pp. 772–773, (2009).

[53]K. Beal, L. E. Abrey, and P. H. Gutin, “Antiangiogenic agents in the treatment of recurrent or newly diagnosed glioblastoma: analysis of single-agent and combined modality approaches,” *Radiat. Oncol.*, vol. 6, p. 2, (2011).

[54]Z. Zhu *et al.*, “Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells,” *J. Exp. Med.*, (2017).

[55]A. H. Stegh, “Targeting the p53 signaling pathway in cancer therapy,” *Expert Opin. Ther. Target*, vol. 16, pp. 67–83, (2012).

[56]F. F. Lang *et al.*, “Phase I trial of adenovirus-mediated p53 gene therapy for recurrent glioma: Biological and clinical results,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 21, pp. 2508–2518, (2003).

[57]V. J. N. Bykov *et al.*, “Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound,” *Nat Med*, vol. 8, pp. 282–288, (2002).

[58]F. M. Boeckler, A. C. Joerger, G. Jaggi, T. J. Rutherford, D. B. Veprintsev, and A. R. Fersht, “Targeted rescue of a destabilized mutant of p53 by an in silico screened drug,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, pp. 10360–5, (2008).

Relatório de Farmácia Comunitária

Abreviaturas

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

MICF – Mestrado Integrado de Ciência Farmacêuticas

OF – Ordem dos Farmacêuticos

SWOT – Pontos fortes, Pontos fracos, Oportunidades e Ameaças, do inglês *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*

I. Nota Introdutória

Nos dias que decorrem, o papel do farmacêutico vai cada vez mais além da cedência do medicamento. Caracterizando-se por um conjunto de processos clínicos tais como a cedência, a revisão da terapêutica, a indicação, a educação para a saúde, a docência, a farmacovigilância, o seguimento farmacoterapêutico, levando a uma diferenciação e competência da profissão farmacêutica na prestação de serviços e no aconselhamento de excelência ao utente, combatendo assim as atuais ameaças apresentadas a essa.

Definido nos estatutos da Ordem dos Farmacêuticos (OF), o Farmacêutico é “um agente de saúde, cumprindo-lhe executar todas as tarefas relativas aos medicamentos, às análises clínicas ou análises de outra natureza que sejam suscetíveis de contribuir para a salvaguarda da saúde pública, bem como as ações de educação dirigidas à comunidade no âmbito da promoção da saúde e prevenção da doença.”(1)

Tendo como objetivo a consolidação dos conhecimentos adquiridos no decorrer dos quatro anos e meio de formação e uma adicional introdução de novos, surge o Estágio Curricular que integra o plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC). Tornando-se num fator crítico na criação de farmacêuticos com as devidas competências sociais e profissionais necessárias à profissão, sendo um primeiro ponto de contacto com a realidade laboral.

O meu estágio curricular foi realizado na Farmácia Adriana (FA), em Coimbra, compreendido entre os meses de janeiro a abril do presente ano, sob a orientação do Diretor Técnico, Dr. João Pimentel e com o apoio de uma equipa excelente e dedicada. Aproveito desde já para expressar a minha gratidão pela atenção a toda a equipa que me acompanhou durante este percurso, oferecendo-me as ferramentas necessárias para a integração no mundo profissional.

O propósito do presente Relatório de Estágio é uma análise crítica às atividades desenvolvidas no estágio, assim como os conhecimentos e aptidões que foram adquiridos durante a realização do mesmo. Encontrando-se sob a forma de uma análise SWOT (*Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*) onde visa a descrição dos aspetos forte e dos menos positivos do estágio.

2. Análise SWOT

2.1 Pontos Fortes

2.1.1 Integração na equipa da Farmácia Adriana

A FA apresenta uma equipa dinâmica, competente e essencialmente jovem. Tornando a adaptação a este novo desafio mais acessível, uma vez que passaram pela mesma situação não há muito tempo. Isto vai permitir uma melhor integração na equipa, assim como um aceleração do nosso processo de aprendizagem, pois têm noção das nossas dificuldades, talvez até mais cedo do que nós próprios. De destacar a forte cooperação e trabalho de equipa presentes neste grupo, que contribuem para um serviço de excelência prestado ao utente.

Na FA, tive a oportunidade de acompanhar as tarefas realizadas por cada profissional que comigo partilharam os seus conhecimentos e a sua experiência. O profissionalismo desta equipa é evidente, pois mesmo tendo um número reduzido de elementos, o cansaço e a carga excessiva de trabalho não afetaram o seu desempenho ou a sua relação com os clientes. Inseridos no contexto desta dinâmica interna da farmácia, os estagiários puderam seguir o modelo de atendimento ao cliente que é base na dinâmica da farmácia e que diferencia os serviços prestados.

2.1.2 Diversidade das funções executadas

Na fase inicial do estágio na FA, comecei por realizar algumas tarefas em *backoffice* como conferência de receituário e gestão de stocks. Progressivamente fui passando para a área do balcão com acompanhamento e supervisão dos profissionais. Apesar de ser um processo transversal a quase todas as farmácias, acho importante de mencionar, visto dar a oportunidade aos estagiários executarem uma série de atividades que permitem o contacto com os nomes comerciais dos medicamentos e o seu respetivo lugar de arrumação, obtendo uma visão integrada do modo de funcionamento da farmácia.

O próximo passo foi adquirir experiência e tato, para elevar o papel do farmacêutico além da simples dispensa de medicamentos. Visando a educação do utente para questões de saúde pública, o acompanhamento, se possível, do seu tratamento e revisão da sua terapêutica, entre outras funções. Tornando-se num desafio constante, que obriga o conhecimento sólido dos conceitos estudados, assim como uma contínua atualização destes.

A FA contém um pequeno gabinete como parte integrante da sua infraestrutura, onde os utentes podem realizar a medição do colesterol total, triglicéridos e glicémia. O espaço isolado vai permitir um contacto mais próximo e mais interventivo do farmacêutico com o utente. Ao desempenhar esta função desenvolvi as minhas capacidades de avaliação de determinados parâmetros bioquímicos passíveis de serem determinados na farmácia comunitária. Já a medição da tensão arterial é realizada numa máquina automática localizada no espaço comum da farmácia, assim como a balança da farmácia.

2.1.3 Protocolos com instituições

A FA possui, neste momento, protocolos com algumas instituições de Coimbra que se mostram muito úteis na angariação de novos utentes. A FA responsabiliza-se pelo deslocamento a estas instituições, onde realiza o fornecimento dos medicamentos necessários, e em alguns casos, preparando também a medicação semanal destes utentes. Enquanto estagiário, tive a oportunidade de fornecer esta medicação, confirmar as receitas das instituições e realizar ainda a preparação da documentação para posterior faturação, esta experiência fez-me aperceber como este tipo de protocolos pode influenciar a estabilidade financeira da farmácia.

2.2 Pontos Fracos

2.2.1 Preparação de medicamentos manipulados

A preparação de manipulados é fundamental quando existe, por exemplo, a necessidade de um ajuste terapêutico adequado às características de um determinado utente, ou quando não se encontra disponível no mercado a associação de determinados princípios ativos, ou quando existe mas não na dosagem e forma farmacêutica pretendida.

Contudo, devido ao suprimento dessas necessidades pelas grandes indústrias farmacêuticas, não se tem registado a procura do fabrico de manipulados, levando ao desaparecimento desta prática. Ao longo do meu estágio na FA, não tive a hipótese de fazer nenhum manipulado, nem sequer visualizar a sua preparação.

2.2.2 Localização

A FA localiza-se na Praça da República. O que se poderia pensar como uma vantagem geográfica em relação às restantes farmácias, a sua localização central torna-se a sua grande desvantagem, devido à sua proximidade ao Pólo I da Universidade de Coimbra. Fazendo com que seja uma zona frequentada por jovens, que apresentam uma menor taxa de frequência em espaços como uma farmácia, do que qualquer outra faixa etária.

Outro aspeto inerente à localização, é o reduzido número de lugares de estacionamento, que são praticamente todos ocupados pelos residentes e comerciantes da área. A presença de outra farmácia na mesma rua, e desta se localizar na zona de paragem de autocarros, assim como o elevado número de farmácias na baixa de Coimbra, leva ao aumento da distribuição dos utentes.

Tendo em conta todos estes pormenores, o fluxo de utentes na FA é reduzido, limitando as oportunidades de aprendizagem.

2.2.3 Variedade de produtos veterinários

Na FA a gama existente de produtos de uso veterinário é reduzida. A procura é essencialmente específica e direcionada para os animais de companhia e a concorrência de preços por parte das clínicas veterinárias, faz com que a procura destes produtos seja limitada. Visto isto, não tive muita oportunidade de contacto e consolidação de conhecimentos neste âmbito.

2.3 Oportunidades

2.3.1 Sifarma 2000®

O *Sifarma 2000®*, da *Glint (Global Intelligent Technologies)* é o *software* usado na FA, sendo uma ferramenta de trabalho de grande utilidade que suporta a intervenção profissional farmacêutica e que vai de encontro à necessidade crescente das Farmácias se posicionarem enquanto espaços de saúde únicos e diferenciados.

Este sistema informático vai permitir a simplificação de diversas atividades comuns do dia-a-dia como a gestão de utentes, mantendo o registo dos seus dados, produtos dispensados e vendas suspensas, controlo e correção dos receituários, controlo e gestão de *stocks*, encomendas, prazos de validade e preços.

Adicionalmente, possui uma base de dados limitada de dados científicos, que poderá esclarecer alguma dúvidas pontuais que surjam.

Esta gestão otimizada vai permitir um foco maior no serviço ao utente, uma vez que o tempo disponibilizado a este aumenta com a maior rapidez dos processos.

2.3.2 Desenvolvimento de competência sociais

A principal responsabilidade do farmacêutico é para a saúde e bem-estar do doente e do cidadão em geral, promovendo o direito a um tratamento com qualidade, eficácia e segurança.

De modo a executar um aconselhamento com maior eficácia e centrado nas necessidades dos utentes é necessário que o farmacêutico adapte o seu discurso para que o utente entenda e aceite a informação prestada, tendo em conta a diversidade das personalidades dos utentes relativamente à sua classe social e nível de educação. Diariamente, é necessária uma moldagem constante à linguagem do utente e à sua maneira de ser.

Ao longo do estágio na FA, foi possível aperceber-me do impacto de uma comunicação clara e cordial com os utentes, assim como a importância do conteúdo dessa para a qualidade do serviço. Estas competências só foram possíveis de desenvolver graças à experiência prática.

2.4 Ameaças

2.4.1 Conjuntura económica

As dificuldades económicas das famílias continuam a ser uma realidade nos dias de hoje, limitando o investimento dos utentes aos bens necessários. Além disso, o aparecimento dos medicamentos genéricos levou a que o estado reduzisse a comparticipação dos medicamentos, levando à diminuição das margens de lucro, apesar da manutenção ou aumento das despesas fixas.

Mas não foi só nas famílias que a crise económica deixou marca, também a realidade das farmácias sofreu uma alteração profunda. As sucessivas alterações legislativas aprovadas nos últimos anos vieram aumentar a concorrência no setor com medidas como a liberalização da propriedade, a permissão da venda de MNSRM fora das farmácias e, entre outras, vindo a diminuir a rentabilidade das farmácias com as sucessivas reduções dos preços dos medicamentos e das suas margens.

Estes fatores levaram a uma diminuição número de postos de trabalho nas farmácias comunitárias, também verificando-se que uma grande percentagem dos farmacêuticos recém-formados se encontram a exercer em situações de trabalho precárias e por um período de tempo limitado, não chegando a integrar de forma efetiva a equipa da farmácia após conclusão do estágio profissional.

Todos estes aspetos destabilizam e enfraquecem o setor farmacêutico. Hoje, mais do que nunca, a farmácia necessita de uma boa estratégia de adaptação, de modo a sobreviver à crise e manter a qualidade do serviço prestado.

2.4.2 Venda de MNSRM fora das Farmácias

Uma das grandes ameaças das farmácias comunitárias são as grandes superfícies comerciais que incluem parafarmácias, as quais comercializam produtos de venda livre. As empresas responsáveis pelos ditos espaços têm inúmeras lojas espalhadas pelo país e o seu capital permite-lhes comprar em grande escala, obtendo melhores preços. Este último é o que lhes dá a grande vantagem comercial, visto conseguirem praticar preços que são impensáveis numa farmácia. Neste sentido, ocorreu uma menor procura nas farmácias desse tipo de produtos, fazendo com que as farmácias tivessem que mudar de estratégia de modo a tornarem-se mais aliciantes para o utente.

Estas áreas de venda de MNSRM, poderão ainda potenciar o facto de ocorrer uma auto-medicação descuidada e não aconselhada da população em geral, podendo, em casos extremos, levar a situações clínicas graves. Isto tudo, devido à não obrigação destes estabelecimentos da presença de um farmacêutico.

3. Aconselhamento Farmacêutico

3.1 Caso Clínico I

Uma jovem com cerca de 20 anos dirigiu-se à farmácia e solicitou a pílula do dia seguinte. Questionei a utente há quanto tempo tinha tido relações sexuais à qual me respondeu que tinha sido há menos de 8 horas. Seguidamente, perguntei se a utente tinha utilizado qualquer tipo de contraceptivo, respondendo-me que ela tomava a pílula regularmente. Após uma série de questões, constatei que a utente estava preocupada com o facto de ter sido a primeira vez que teve relações sem preservativo. De modo a tranquilizar a jovem, informei-a que a pílula era um método contraceptivo eficaz, mais eficaz que o preservativo, mas que não prevenia a transmissão de doenças sexualmente transmissíveis. Aconselhei-a a não tomar a pílula do dia seguinte, visto também que esta apresenta efeitos hormonais significativos.

3.2 Caso Clínico 2

Sendo que o meu estágio decorreu no Inverno, muitos dos utentes solicitavam-se medicação para a tosse. Neste tipo de caso, tentava saber se o utente apresentava tosse seca ou com expetoração, há quanto tempo decorria, a sua frequência assim como outros sintomas. A maioria dos utentes apresentava tosse com expetoração à qual aconselhava a toma de um mucolítico, informando como tomar, e a ingestão de líquidos com maior frequência, se a tosse não melhorasse dentro de 3 a 5 dias o utente deveria se dirigir ao médico.

4. Conclusão

O estágio curricular constituiu uma experiência pessoal bastante enriquecedora, permitindo adquirir as ferramentas essenciais para no futuro poder desempenhar a profissão de farmacêutico com a competência, a independência e o profissionalismo devidos. Este contacto com uma nova realidade permitiu-me uma melhor compreensão do funcionamento interno de uma farmácia comunitária, assim como das necessidades reais dos utentes da mesma.

Pude constatar que o papel farmacêutico, para além da componente científica, essencial para o pleno desempenho da sua função, engloba também uma componente social muito grande. Este representa para o utente muito mais de que a pessoa que lhe fornece a medicação. A confiança, à partida entre o profissional de saúde e o cliente é enorme e só pode ser compreendida com um serviço exímio.

Para finalizar, queria destacar todos os elementos da Farmácia Adriana não só pela transmissão de conhecimentos e experiências, como também pela acessibilidade, que permitiu desde logo a minha integração, pelo excelente profissionalismo e acima de tudo pelos laços de amizade para a vida criados.

4. Bibliografia

I. Ordem dos Farmacêuticos - Boas Práticas Farmacêuticas para a Farmácia Comunitária.(2009) Acedido em 27/08/2017 Disponível na Internet:

http://www.ordemfarmaceuticos.pt/xFiles/scContentDeployer_pt/docs/Doc3082.pdf.

Relatório de Indústria Farmacêutica

Abreviaturas

ARS – Associação Regional de Saúde

BPD – Boas Práticas de Distribuição

CDM – Código do dispositivo médico

DM – Dispositivo médico

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

MICF – Mestrado Integrado de Ciências Farmacêuticas

SGS – *Société Générale de Surveillance*

SPMS – Serviços Partilhados do Ministério de Saúde

SWOT – Pontos fortes, Pontos fracos, Oportunidades e Ameaças, do inglês *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*

I. Introdução

Ao longo do Mestrado Integrado de Ciências Farmacêuticas (MICF) a nossa perceção sobre a variedade de trabalhos ao quais o farmacêutico está apto vai aumentando. Apercebemo-nos que o papel do farmacêutico poderá não passar pela farmácia comunitária, mas sim por uma panóplia de profissões como a produção e controlo de qualidade em indústria farmacêutica, análises clínicas, e área regulamentar e distribuição.

A possibilidade de escolha entre as diversas áreas do setor farmacêutico pelas quais teríamos interesse de realizar o estágio curricular é uma oportunidade única para expandir os nossos conhecimentos, assim como os nossos horizontes. Permitindo ainda enfrentar novos desafios que nos fazem progredir a nível profissional, como também a nível pessoal. Sendo assim, decidi enveredar por um estágio dividido entre a farmácia comunitária e a indústria farmacêutica.

O estágio na empresa *Overpharma – Produtos Médicos e Farmacêuticos, Lda* decorreu durante os meses de junho e agosto do ano 2017.

O relatório apresentado encontra-se sob a forma de uma análise SWOT (*Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*), onde irei focar a análise do ambiente interno, em que se identificam os pontos fortes e fracos, e a análise do ambiente externo, em que se incluem as ameaças e oportunidades.

2. Análise SWOT

2.1 Pontos Fortes

2.1.1 Recursos Humanos

Tive a oportunidade de estagiar com uma equipa de excelência e dedicada, na qual a boa disposição era notória. Apesar de se tratar de uma equipa pequena, demonstra um bom dinamismo e organização profissional, que me recebeu e integrou muito bem logo desde início. O meu estágio foi acompanhado e orientado pela Diretora Técnica, Dr^a Ana Isabel Nunes, que sempre se demonstrou acessível e disposta a ajudar com qualquer dúvida ou problema que surgisse. Sendo este, um aspeto de enorme relevo, visto de se tratar do meu primeiro contacto com esta realidade, exigindo um esforço e dedicação por parte da Dr^a Ana em tentar transmitir-me o máximo de conhecimentos nesta área.

2.1.2 Grupo FHC Farmacêutica

A *Overpharma*, assim como várias empresas, pertence ao grupo FHC. Este grupo engloba as áreas de indústria, produção, distribuição, promoção, gestão logística, consultoria e serviços. Este estágio transmitiu-me uma noção de como muitas destas empresas operam entre si. Constatando o rigor e eficácia de todas as tarefas realizadas, com vista a garantir a manutenção da qualidade já associada ao grupo.

2.1.3 Adquirir conhecimentos sobre as Boas Práticas de Distribuição (BPD)

Sendo a *Overpharma* uma empresa de distribuição por grosso de produtos médicos e farmacêuticos, é-nos praticamente obrigatório o contacto com os princípios e normas das BPD, de modo a entender quais os requisitos e exigências necessários a um bom desempenho das suas atividades. A prática destes conceitos mudou a minha perceção em relação a como uma empresa deste calibre age perante determinadas situações.

2.1.4 Aprofundar conceitos relativos aos dispositivos médicos (DMs)

Sendo a área relativa à distribuição de DMs a de mais valor na *Overpharma*, foi-me aconselhado a análise do Decreto-Lei n.º 145/2009, de 17 de Junho adaptado da Directiva n.º 93/42/CEE, do Conselho, de 14 de Junho, relativo aos DMs (I). Esta análise permitiu a complementação e o aprofundamento dos conceitos até já apreendidos, conceitos estes que até à data eram muito gerais. Abrangendo aspetos como a classificação dos DMs até à

documentação requerida para a comercialização desses. Sendo mais específico, o primeiro divide os DMs em quatro classes (I, IIa, IIb e III) designadas de acordo com o efeito exercido no corpo humano e potenciais riscos na conceção e fabrico. Já os últimos englobam a declaração de conformidade concebida pelo fornecedor, o certificado CE elaborado pelo Organismo Notificado, que em caso de o DM ser de classe I-estéril ou superior era obrigado à colocação do número de identificação, constituído por quatro dígitos juntamente com a marcação CE.

Também para a sua comercialização, a rotulagem e o folheto informativo dos DMs tinham de respeitar certos parâmetros: o folheto informativo tinha de se apresentar redigido pelo menos em português e os rótulos tinham de conter uma descrição em português, marcação CE (se necessário), nome comercial, morada do fabricante e mandatário se o fabricante não pertencer a um estado-membro, e ainda simbologia relacionada com o seu estado de esterilização.

2.1.5 Norma ISO 9001

A *Overpharma* é atualmente uma empresa certificada pela Norma ISO 9001:2008 pela SGS (*Société Générale de Surveillance*). A adoção de um sistema de gestão da qualidade é uma decisão estratégica da empresa, de modo a auxiliar a melhoria do seu desempenho global e proporcionar uma base sólida para iniciativas de desenvolvimento sustentável. Tive a oportunidade de analisar um relatório de uma auditoria interna, concedendo-me a hipótese de analisar as oportunidades de melhoria, ações corretivas e preventivas assim como não conformidades propostas à empresa com vista à melhoria da mesma. Também foi aconselhado realizar uma análise da Norma ISO 9001:2015 sendo as maiores diferenças em relação à anterior, a meu ver, uma maior facilidade na organização dos documentos e a implementação da análise de risco.(2)

2.1.6 Visita às instalações do armazém FHC

O armazém onde são armazenados e distribuídos os produtos comercializados pela *Overpharma*, encontra-se situado em Mortágua. Esse armazém pertence ao grupo FHC, este sendo subcontratado pela *Overpharma*. Contudo, tive a possibilidade de visitar as instalações, onde me foi explicado o seu funcionamento e organização, constatando que a empresa procura a constante otimização do espaço, assim como fornecer as condições ideais específicas aos diferentes tipos de produto. Além disto, ofereceu-me a oportunidade de observar as BPD em prática.

2.1.7 Sistema informático Primavera

O sistema informático utilizado pela empresa, para a consulta de informações sobre os clientes, produtos e outros assuntos abrangendo todo o espectro de atividades da *Overpharma*, é o Primavera. Tratou-se do meu primeiro contacto com este sistema, que até à data era do meu desconhecimento. Atualmente, todas as empresas necessitam de um sistema informático no que toca à otimização do trabalho da mesma. Sendo fundamental desde a gestão de *stocks* à garantia da rastreabilidade de todos os produtos desde a aquisição até ao fornecimento, e, no processo de reclamações, devoluções e recolha.

2.2 Pontos fracos

2.2.1 Presença simultânea de dois estagiários

Ao longo dos três meses do estágio na *Overpharma*, os dois meses iniciais coincidiram com os dois finais do meu colega também estagiário proveniente da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC). Apesar de considerar que a troca de experiências e a partilha de alguns conhecimentos adquiridos entre estagiários seja benéfica, o cruzamento do tempo de estágio, dificultou um acompanhamento mais personalizado por parte da equipa técnica. Uma vez que o meu colega também iniciou o estágio mais cedo, era já expectável, que aquando do princípio do meu estágio, que ele tivesse uma maior noção do funcionamento da empresa. Isto levou a uma divisão de tarefas, das quais me foram designadas as tarefas mais monótonas devido à falta de experiência, atrasando o meu ritmo inicial de aprendizagem. No entanto, o acompanhamento aos dois estagiários manteve-se e as pequenas alterações inerentes ao crescimento de uma equipa motivou uma capacidade de adaptação natural de um setor em constante mudança, sendo um pequeno ensinamento para o futuro profissional.

2.2.2 Sazonalidade do estágio

O meu estágio na *Overpharma*, como já referido, decorreu entre junho e agosto. Constatei que nesta altura do ano a maioria das empresas trabalha a “meio-gás”, uma vez que muitos dos seus funcionários entram de férias. Contudo, o nosso trabalho depende muito de informações e documentos fornecidos por essas empresas externas, confrontando situações em que a pessoa responsável pela documentação estava ausente, levando à falta temporária da documentação necessária à comercialização dos produtos por elas vendidos, fazendo com que todo o processo se atrase. O mesmo também ocorreu a nível interno,

visto ser estagiário por vezes necessitava de uma confirmação de algum colaborador da *Overpharma* para poder prosseguir com algum tipo de processo, o que me era impossibilitando visto esse colaborador se apresentar de férias nesse momento. Acabando por acumular-se trabalho devido à espera de uma resposta.

2.3 Oportunidades

2.3.1 Nichos de mercado

Em Portugal, existem certos mercados em relação a determinados DM que não são explorados ou são, mas por uma ou duas empresas, não demonstrando grande competitividade. Durante o meu estágio na *Overpharma*, pude constatar a busca constante da empresa por estes nichos. Na qual também tive o privilégio de participar, mas não pude analisar os resultados dessa pesquisa devido à data de finalização do meu estágio. Neste caso específico, o produto tratava-se de uma variedade de modelos de fraldas para incontinência urinária. O processo de pesquisa foi realizado desde se este tipo de produto se categorizava como um DM, até ao registo deste no Infarmed, I.P. É nestas ocasiões que uma boa empresa se destaca, e como uma empresa ainda pequena, a *Overpharma* tem de se evidenciar ao poucos e aproveitar qualquer oportunidade que surja para se posicionar na vanguarda da competição.

2.3.2 Auditoria externa

Durante estes 3 meses, tive a possibilidade de acompanhar a realização de uma auditoria externa ao armazém do grupo FHC, que como já referi anteriormente, este grupo é subcontratado pela *Overpharma*. A auditoria foi realizada por uma pessoa que examina minuciosa e independentemente se as atividades assim como as infraestruturas preenchem todos os requisitos da Norma ISO (neste caso a ISO 9001:2008) e das BPD. Tratou-se de uma auditoria de dois dias, no primeiro a auditoria decorreu no armazém de Mortágua, e no segundo decorreu nas instalações da *Overpharma* em Lisboa. Porém, não tive a oportunidade de acompanhar o segundo dia da auditoria. No término do processo, é entregue à empresa um relatório que contém as não conformidades encontradas para as quais deverão ser tomadas medidas corretivas ou preventivas, assim como as oportunidades de melhoria da empresa. Um pormenor que gostaria de dar relevância é a interpretação da Norma ISO 9001:2008 e da BPD a ser posta em prática, que me proporcionou uma nova perspetiva na garantida da qualidade.

2.4 Ameaças

2.4.1 Pouco conhecimento prévio sobre a área dos dispositivos médicos

Apesar de toda a diversidade de temas abordados ao longo do percurso académico no MICEF, um tema que não é praticamente abrangido em cadeiras não opcionais, é o dos DMs. Visto não ter sido a minha escolha para cadeira opcional de DMs, apresentou-me uma dificuldade inicial em discernir qual o papel do farmacêutico nesta área. Claro que pode ser argumentado que o estágio serviu para isso mesmo, preencher algumas lacunas do plano curricular do MICEF, lacunas que surgem devido à especificidade do assunto. Contudo, os conceitos básicos relativos aos DM, como referido nos pontos fortes, advindos do Decreto-Lei n.º 145/2009, de 17 de Junho, deveriam ser pelo menos mencionados durante os 5 anos. De modo a facilitar o início em empresas como a *Overpharma* em que o sector dos DMs é dominante, evitando ter de se começar da estaca zero.

2.4.2 Empresas multinacionais

Visando a redução de custos, o estado viu-se forçado à realização de cortes, sendo área da saúde das mais afetadas. De modo a que os hospitais públicos possam adquirir DMs ou medicamentos ao menor preço possível, são realizados leilões organizados pela Associação Regional de Saúde (ARS), assim como o catálogo SPMS (Serviços Partilhados do Ministério de Saúde) que disponibiliza os 3 produtos mais baratos que podem ser adquiridos. Este aspeto vai favorecer as empresas de maior calibre, uma vez que conseguem obter um custo de fabrico inferior comparado ao das empresas de menor calibre, devido à produção em grande escala. Assim, conseguem reduzir o preço dos medicamentos ou DMs aos hospitais com uma margem de lucro maior, que por sua vez, as empresas mais pequenas se quiserem de alguma forma competir, têm de reduzir ao máximo as suas margens por forma a fazerem parte das escolhas do estado.

2.4.3 Codificação dos produtos pelo INFARMED

Para os DM serem candidatos a concursos públicos, é necessário que esses sejam classificados por grupos que apresentem características comuns e obtenham o código do dispositivo médico (CDM). Esta medida implementada veio a favorecer a transparência na comercialização de DM. Contudo, este método de codificação dos produtos na maioria das vezes atrasa-se, o que pode levar à não inscrição da empresa em certos concursos públicos. De modo a evitar que tal aconteça, a empresa solicita uma emissão de certificação pelo

INFARMED, apresentando custos associados à *Overpharma*. Este aspeto apresenta-se como um fator limitante, devido à impotência da empresa, por vezes, não poder nem sequer inscrever-se em concursos públicos devido aos atrasos na codificação por parte do INFARMED.

3. Conclusão

A realização do estágio curricular na *Overpharma* tornou-se numa das experiências mais desafiadoras que já enfrentei. Não só pela mudança de cidade, como também pela absorção de outra cultura, mais especificamente, uma cultura empresarial. Onde consegui compreender o quão fundamental é o papel do farmacêutico no mundo da indústria. Este resultado não seria possível sem uma grande equipa por trás a apoiar todo o meu trabalho, que me proporcionou uma mudança de carácter graças à sua frontalidade, dando-me uma nova perspetiva do farmacêutico como um profissional de saúde.

O estágio opcional foi uma mais-valia, além de me introduzir à área comercial do sector farmacêutico, permitiu-me uma aprendizagem mais pormenorizada de um tema vagamente falado no decorrer do MICE. Além do mais, transmitiu-me novos conceitos e ideologias não só acerca da indústria farmacêutica como também do mundo do trabalho em geral.

Não esquecendo o prestígio de poder estagiar numa empresa integrante de um grupo de renome na área da indústria farmacêutica em Portugal, oportunidade facultada pelo MICE.

4. Bibliografia

1. Decreto-Lei n.º 145/2009 - Diário da República n.º 115/2009, Série I de 2009-06-17 - DRE - [Em linha] [Consult. 11 jul. 2017]. Disponível em [:https://dre.pt/web/guest/pesquisa//search/494558/details/maximized](https://dre.pt/web/guest/pesquisa//search/494558/details/maximized)
2. IPQ - NP EN ISO 9001:2015 - Sistemas de gestão da qualidade Requisitos (ISO 9001:2015). Instituto Português da Qualidade. 2015).