



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Ana Patrícia Ramos da Fonseca

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Células T CAR e novas abordagens terapêuticas: terapia combinada com vírus oncolíticos e células NK” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Márcia Inês Ferreira, do Dr. Nuno José Canedo Linhares de Castro e do Professor Doutor Sérgio Paulo Magalhães Simões, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2020



# UNIVERSIDADE D COIMBRA

Ana Patrícia Ramos da Fonseca

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Células T CAR e novas abordagens terapêuticas: terapia combinada com vírus oncolíticos e células NK” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Márcia Inês Ferreira, do Dr. Nuno José Canedo Linhares de Castro e do Professor Doutor Sérgio Paulo Magalhães Simões apresentados à Faculdade da Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2020

Eu, Ana Patrícia Ramos da Fonseca, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2015239518, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Células T CAR e novas abordagens terapêuticas: terapia combinada com vírus oncolíticos e células NK” 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, 3 de setembro de 2020.

Ana Patrícia Ramos da Fonseca

(Ana Patrícia Ramos da Fonseca)

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer ao Professor Doutor Sérgio Simões por todo o tempo e orientações disponibilizados ao longo de toda a construção da monografia.

À Dra. Márcia Ferreira e ao resto da equipa da BasePoint Consulting Services por todo o conhecimento que me passaram e pelo incentivo constante.

Ao Dr. Nuno Linhares de Castro e ao resto da equipa, em especial à Márcia Parada e à Beatriz Pissarra por todo carinho desde o primeiro ao último dia, por nunca deixarem uma dúvida por esclarecer e por me mostrarem o que realmente é o verdadeiro espírito de equipa.

À minha madrinha, Patrícia, por ser incansável e uma amiga para a vida que nunca me deixou ficar para trás e me transmitiu os melhores valores e conselhos dentro e fora da faculdade.

Ao meu irmão, Jorge, por sempre acreditar em mim e nas minhas capacidades e nunca me deixar ir abaixo.

À tia Amélia por todos os conselhos.

A todas as amizades feitas na cidade de Coimbra, que fizeram de mim uma pessoa melhor e mais feliz por as levar no meu coração.

Aos meus pais,  
por todo o apoio, dedicação, carinho e confiança que depositaram em mim desde o primeiro dia de faculdade.

Pelas chamadas de atenção e pelos conselhos sábios que me tornaram uma pessoa mais responsável.

Por estarem sempre à distância de um telefonema e sempre preocupados com o meu bem-estar.

Pelas noites mal dormidas à espera que eu mandasse uma mensagem a dizer que já estava em casa de madrugada.

Por serem incansáveis em qualquer circunstância e me fazerem lutar pelos meus sonhos e objetivos.

Por serem desde sempre o meu cantinho seguro, onde sei que posso regressar a qualquer altura.

Tudo o que me tornei ao longo destes anos devo a vocês e um obrigado nunca será suficiente para demonstrar a minha gratidão.

A Coimbra por todas as memórias e ensinamentos que levo comigo para a vida.

*“Adoramos a perfeição, porque não a podemos ter; repugná-la-íamos, se a tivéssemos. O perfeito é desumano, porque o humano é imperfeito.”*

*(in “livro do Desassossego”, Fernando Pessoa)*

## ÍNDICE

### PARTE I: RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM ASSUNTOS REGULAMENTARES

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
NOTAS INTRODUTÓRIAS.....	10
A BASEPOINT CONSULTING SERVICES .....	11
ATIVIDADES DESENVOLVIDAS AO LONGO DO ESTÁGIO .....	11
ANÁLISE SWOT .....	13
PONTOS FORTES.....	13
Receção e integração na empresa .....	13
Formações Internas .....	14
Autonomia e responsabilidade no desempenho das tarefas.....	14
Desenvolvimento de competências .....	15
PONTOS FRACOS.....	15
Empresa pequena .....	15
Dependência dos Clientes.....	15
Duração do estágio.....	16
OPORTUNIDADES.....	16
Reunião com clientes .....	16
Aplicação de conhecimentos adquiridos em cadeiras do curso.....	16
AMEAÇAS.....	17
Área de medicamentos de Uso Humano.....	17
Pobre abordagem de determinados conteúdos durante o MICF.....	17
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	18

### PARTE II: RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

LISTA DE ABREVIATURAS.....	20
NOTAS INTRODUTÓRIAS.....	21
A FARMÁCIA MACHADO .....	22
A FARMÁCIA DA ESTAÇÃO.....	22
ANÁLISE SWOT .....	23
PONTOS FORTES.....	23
A equipa técnica da FEG.....	23
Pertencer a um grupo de farmácias .....	24
Entrada em vigor da circular n° 0261-2020 sobre as normas de dispensa de medicamentos .....	24
PONTOS FRACOS.....	25
Pouca variedade de cosméticos e semelhantes.....	25
Falta de contato com a prática profissional durante o curso.....	25
Interpretação de receitas manuais .....	26
OPORTUNIDADES.....	26
Entregas ao domicílio, aldeias e FarmaDrive.....	26
Histórico de medicação associado a cada utente .....	27
AMEAÇAS.....	27
Falta de medicamentos na farmácia.....	27

Pandemia da COVID-19 .....	28
CASO PRÁTICO .....	28
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
<b>PARTE III: CÉLULAS T CAR E NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS: TERAPIA COMBINADA COM VÍRUS ONCOLÍTICOS E CÉLULAS NK</b>	
LISTA DE ABREVIATURAS.....	32
RESUMO.....	34
ABSTRACT .....	35
I. INTRODUÇÃO .....	36
II. TERAPIA CELULAR ADOTIVA: CÉLULAS T CAR.....	37
Contextualização histórica das células T CAR .....	37
Células T CAR .....	37
Domínios das células T CAR.....	38
Evolução das células T CAR .....	38
Produção de células T CAR.....	40
Toxicidade associada às células T CAR.....	41
On-target, on-tumor / CRS e neurotoxicidade.....	41
On-target, Off-tumor .....	42
Off-target, Off-tumor .....	43
III. SUCESSO DAS CÉLULAS T CAR EM TUMORES DE CÉLULAS B.....	43
IV. CÉLULAS T CAR PARA ALÉM DAS CÉLULAS B .....	44
Desafios das células T CAR nos tumores sólidos.....	45
V. JUNÇÃO DE CÉLULAS T CAR A VÍRUS ONCOLÍTICOS PARA TRATAMENTO DE TUMORES SÓLIDOS .....	46
Propriedades dos vírus oncolíticos .....	47
Vírus oncolíticos como imunoterapia.....	48
Combinação de vírus oncolíticos e terapia celular adotiva .....	49
Adenovírus e células T CAR.....	50
Adenovírus.....	50
Adenovírus como agente oncolítico .....	51
Terapêutica combinada de células T CAR e adenovírus.....	51
VI. ALTERNATIVA À UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS T CAR: CÉLULAS CAR-NK.....	54
Células NK.....	55
Células T CAR versus Células NK CAR.....	56
VII. QUESTÕES ÉTICAS E ECONÓMICAS .....	57
Ética .....	58
Economia.....	59
VIII. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS .....	59
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
<b>ANEXO.....</b>	<b>66</b>



# **PARTE I**

## **RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM ASSUNTOS REGULAMENTARES**

**Basepoint Consulting Services**

**COIMBRA**

Sob orientação da Dra. Márcia Inês Ferreira



UNIVERSIDADE D  
**COIMBRA**

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**AR:** Assuntos Regulamentares

**CE:** Comissão Europeia

**CIR:** *Cosmetic Ingredient Review*

**CLP:** *Classification, Labelling and Packaging*

**CPNP:** *Cosmetic Products Notification Portal*

**CTD:** *Common Technical Document*

**DGAV:** Direção-Geral da Alimentação e Veterinária

**ECHA:** *European Chemicals Agency*

**INFARMED, IP:** Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

**MICF:** Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**PIF:** *Product Information File*

**PME:** Pequena e Média Empresa

**REACH:** *Registration, Evaluation and Authorization of Chemical Substances*

**SCCS:** *Scientific Committee On Consumer Safety*

**SWOT:** *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*

**UE:** União Europeia

## NOTAS INTRODUTÓRIAS

Apesar de farmácia comunitária ser talvez a área que mais integra farmacêuticos e que na comunidade está designada como profissão do farmacêutico, existem outras vertentes nas quais o seu papel assume elevada importância, nomeadamente na área de Assuntos Regulamentares (AR).

A Faculdade de Farmácia dá-nos a oportunidade de escolher entre vários estágios para além de farmácia comunitária e hospitalar, uma vez que esta criou protocolos com diversas entidades em diferentes áreas. Assim sendo decidi por iniciativa própria envergar o meu estágio na área de Assuntos Regulamentares, uma vez que sempre me suscitou muita curiosidade e queria conhecer melhor e aprender mais sobre o papel do farmacêutico em contexto prático. Escolhi realizar este estágio na empresa BasePoint Consulting Services, que para além de satisfazer o meu interesse na área regulamentar, permitiu alargar os meus conhecimentos no âmbito dos produtos cosméticos, um dos principais focos desta empresa.

Desempenhei funções desde o dia 6 de janeiro a 13 de março de 2020.

O presente relatório tem como objetivos finais uma reflexão sobre esta experiência e uma análise SWOT identificativa dos Pontos Fortes (*Strengths*), Pontos Fracos (*Weaknesses*), Oportunidades (*Opportunities*) e Ameaças (*Threats*) que encontrei ao longo do período de estágio.

## **A BASEPOINT CONSULTING SERVICES**

A BasePoint Consulting Services é considerada uma pequena e média empresa (PME) constituída por quatro pessoas, fundada em 2015, que pretende auxiliar os clientes através de serviços de consultoria e trabalha essencialmente com produtos cosméticos, suplementos alimentares, biocidas e dispositivos médicos. Consegue fazer chegar os seus serviços não só a Portugal, mas também à União Europeia (UE) e resto do mundo, sobretudo ao Brasil. (1)

Tem um conhecimento muito abrangente sobre legislação dos produtos com que trabalha o que simplifica a sua atuação e permite dar uma resposta mais competente aos clientes. Não é constituída apenas por Mestres em Ciências Farmacêuticas, contando também com uma jurista e um licenciado em Farmácia Biomédica. (1)

## **ATIVIDADES DESENVOLVIDAS AO LONGO DO ESTÁGIO**

Inicialmente adquiri formação sobre o que são, para que servem e como se utilizam corretamente o Regulamento (CE) n.º 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 30 de Novembro de 2009 e a DECISÃO DE EXECUÇÃO DA COMISSÃO de 25 de novembro de 2013 relativa a orientações para aplicação do anexo I do Regulamento (CE) n.º 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho relativos aos produtos cosméticos. Para além disso explicaram-me o papel do *Registration, Evaluation and Authorization of Chemical Substances* (REACH), isto é, o registo, avaliação e autorização de substâncias químicas e do Regulamento *Classification, Labelling and Packaging* (CLP) que é relativo à classificação, embalagem e rotulagem de substâncias ou misturas.

Nos dias seguintes à formação tive oportunidade de avaliar rótulos de produtos cosméticos e fazer as alterações necessárias para que os mesmos estivessem conforme as normas. Posteriormente segui para a parte da toxicologia onde através de várias bases de dados nomeadamente o *Scientific Committee On Consumer Safety* (SCCS), o *Cosmetic Ingredient Review* (CIR), a *European Chemicals Agency* (ECHA) e a Direção-Geral da Alimentação e Veterinária (DGAV) construí o perfil toxicológico de vários ingredientes utilizados em produtos cosméticos.

Mais tarde, foi-me dada a tarefa de criar vários *Product Information Files* (PIF's), ou seja, um ficheiro de informação de um produto cosmético para clientes reais. Neste tipo de documento encontram-se todas as informações quer a nível de matérias primas, quer de produto acabado necessárias para a introdução do produto na UE.

O PIF contém 2 partes, A e B, sendo que a parte A é uma compilação de toda a informação recolhida sobre as características, estabilidade e segurança das matérias-primas e do produto cosmético acabado e a parte B prende-se com a realização da avaliação de segurança do produto para o consumidor final. Este relatório é elaborado por um avaliador de segurança, que deve ser obrigatoriamente “*uma pessoa que possua um diploma ou outra prova formal de habilitações adquiridas com a conclusão de um curso universitário teórico e prático, em farmácia, toxicologia, medicina ou disciplina semelhante, ou de um curso reconhecido como equivalente por um Estado-Membro*” (2), cujas qualificações são apresentadas na parte final do PIF.

A introdução do produto no mercado obriga que sejam cumpridos requisitos referentes à rotulagem e que seja feita a sua notificação no *Cosmetic Products Notification Portal* (CPNP), que consiste num portal *online* onde é necessário registar os produtos cosméticos. A partir do momento em que um produto se encontra registado neste portal, não é necessária qualquer notificação adicional noutro Estado-Membro da UE, uma vez que este portal é europeu.

Caso o produto entre pela alfândega portuguesa, é necessário pedir um documento de conformidade ao INFARMED IP. Se este achar que a informação não é suficiente para garantir a segurança do produto, pode pedir o PIF para aprovar ou não a entrada do produto cosmético em Portugal.

## ANÁLISE SWOT

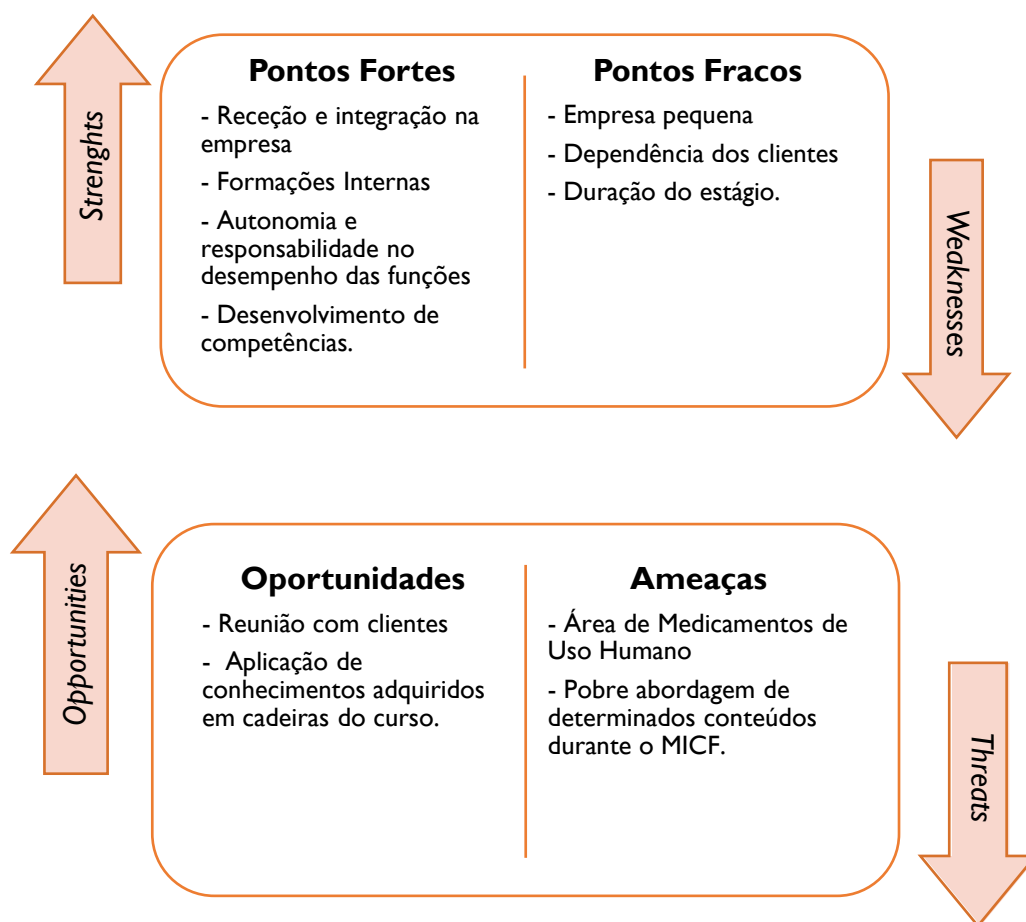


Figura 1 – Análise SWOT referente ao estágio na empresa BasePoint Consulting Services.

### PONTOS FORTES

#### Recepção e integração na empresa

No primeiro dia de estágio fui extremamente bem recebida e ao longo do tempo que estagiei na BasePoint pude integrar uma equipa jovem, simpática, dinâmica, focada, responsável e com espírito de equipa genuíno onde todas as decisões são discutidas e tomadas em conjunto. Todos estes fatores permitiram-me sentir integrada, o que facilitou o esclarecimento de dúvidas e a possibilidade de expor a minha opinião em relação a determinados tópicos abordados. Durante todo o tempo de estágio tive um plano bem definido semelhante às tarefas reais desempenhadas pelos Mestres em Ciências Farmacêuticas na empresa o que me permitiu ficar com uma ideia verdadeira e clara do papel deste profissional em consultoria de produtos cosméticos.

## **Formações Internas**

Outro dos pontos fortes do meu estágio, relaciona-se com o facto de antes de iniciar qualquer tipo de tarefa nova, ter recebido formações internas por parte dos colaboradores, facilitando a minha integração no ambiente de trabalho e nas várias tarefas. Como já referi anteriormente, nos primeiros dias de estágio tive contacto pela primeira vez com determinados Regulamentos, Decretos-Lei, Decisões de Execução que são a base da legislação dos produtos cosméticos na União Europeia através de uma formação exaustiva dada pelo Dr. David Costa. Esta formação permitiu-me também perceber a distinção entre Regulamento, válido em toda a UE e Decreto-Lei, publicado em Diário da República que é referente às leis de cada país, neste caso Portugal.

Também no âmbito das formações dadas pelo Dr. David, explicaram-me a diferença entre produto e artigo cosmético, sendo a definição legal de cosmético: *“qualquer substância ou mistura destinada a ser posta em contacto com as partes externas do corpo humano (epiderme, sistemas piloso e capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos) ou com os dentes e as mucosas bucais, tendo em vista, exclusiva ou principalmente, limpá-los, perfumá-los, modificar-lhes o aspeto, protegê-los, mantê-los em bom estado ou corrigir os odores corporais.”* (2) e ainda como proceder a uma avaliação de rotulagem e que alegações são permitidas num produto cosmético, matérias que considero essenciais e pertinentes no mercado de cosméticos.

## **Autonomia e responsabilidade no desempenho das tarefas**

Após a fase inicial de integração e de formação, passei a ter o meu computador pessoal e e-mail da empresa para contactar com os membros da equipa e com clientes sempre que fosse necessário.

Durante todo o tempo de estágio senti apoio e incentivo constantes por parte de toda a equipa para a realização das minhas tarefas com autonomia. A partir do momento em que comecei a trabalhar efetivamente para clientes senti o peso da responsabilidade, mas foi-me sempre prestado auxílio e supervisão constantes.

Quer responsabilidade quer autonomia foram objetivos que procurei adquirir, uma vez que as considero essenciais para o trabalho do futuro farmacêutico.

## **Desenvolvimento de competências**

Ao longo de todo o estágio fui adquirindo e aprimorando determinadas competências em várias áreas. Destaco, primeiramente o domínio da língua inglesa que se tornou crucial para a execução de todos os trabalhos que realizei na BasePoint. Todas as pesquisas bibliográficas requeriam conhecimento desta língua como por exemplo na elaboração do perfil toxicológico de um ingrediente cosmético.

É de realçar também o meu desenvolvimento a nível de pesquisa em bases de dados como o SCCS, a ECHA, o CIR e motores de pesquisa como *ToxNet* e *PubMed*.

Todo o trabalho realizado passa pela utilização de ferramentas do *Microsoft Office*<sup>®</sup>, nomeadamente o *Microsoft Word*<sup>®</sup> e *Microsoft Excel*<sup>®</sup>, onde são necessárias várias regras de utilização e de formatação que me foram ensinadas, tornando-se uma mais-valia para o meu futuro.

## **PONTOS FRACOS**

### **Empresa pequena**

A BasePoint ainda é uma empresa pequena e o seu público alvo são também as pequenas empresas que querem introduzir cosméticos, muitas vezes artesanais, no mercado e não tem contacto com grandes empresas como por exemplo a *Vichy*<sup>®</sup> ou *Uriage*<sup>®</sup>, uma vez que estas têm o seu próprio departamento de assuntos regulamentares. Para além disso, não possui laboratório próprio para a realização dos estudos de estabilidade e garantia da qualidade dos produtos cosméticos, tendo uma parceria com um laboratório, o qual não foi possível visitar.

### **Dependência dos Clientes**

Uma empresa de consultoria está sempre dependente dos clientes e das suas necessidades. Todo o trabalho era previamente calculado e organizado de acordo com a maior rapidez de resposta e tendo em conta as informações já recolhidas. Contudo, por vezes, foi necessário iniciar trabalhos sem ter todos os dados necessários que demoravam a ser fornecidos pelos fabricantes e entidades responsáveis e muitas vezes essas tarefas ficavam inacabadas e com notas das informações em falta para mais tarde serem preenchidas.



## **Duração do estágio**

Os quase três meses de estágio na BasePoint, encurtados devido à pandemia da COVID-19, mostraram ser insuficientes para abranger todas as áreas em que a empresa trabalha. Dediquei-me principalmente aos produtos cosméticos não tendo oportunidade de contactar com suplementos alimentares, biocidas ou dispositivos médicos, áreas em que a empresa também foca o seu trabalho e que possivelmente com um estágio de duração mais longa iria ter oportunidade de contactar. Contudo tentei reter ao máximo a informação e as competências adquiridas nesta área que possam ser relevantes para o meu futuro profissional.

## **OPORTUNIDADES**

### **Reunião com clientes**

Tive a oportunidade de assistir a uma reunião da Dra. Cármen Pinto com duas clientes que pretendiam legalizar a comercialização dos seus sabonetes em Portugal e pude perceber quais são os principais passos a executar para essa legalização acontecer. Apesar de ser muito diferente do que acontece com os medicamentos, não deixam de existir passos cruciais a realizar como por exemplo, encontrar um local de produção que não pode ser habitação própria e tem obrigatoriamente de ser aprovado pelo Câmara Municipal do local. Esse local deve estar devidamente equipado e higienizado sendo alvo de auditoria por parte de algum dos membros da empresa BasePoint antes de iniciar a atividade de produção.

### **Aplicação de conhecimentos adquiridos em cadeiras do curso**

O estágio curricular permitiu-me aplicar conhecimentos adquiridos em determinadas áreas científicas abordadas em unidades curriculares do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF).

De acordo com o trabalho que realizei na BasePoint, realço a importância de unidades curriculares como “Dermofarmácia e Cosmética” e “Assuntos Regulamentares do Medicamento”, lecionadas durante o 4º ano do curso e se tivesse contactado com dispositivos médicos suponho que a unidade curricular opcional do 5º ano “Dispositivos Médicos” seria uma mais-valia. Estas unidades curriculares conferiram-me um vasto conhecimento teórico, que se tornou crucial para a integração nos trabalhos realizados durante a minha passagem pela BasePoint.

Para além destas unidades curriculares principais, outras áreas como Toxicologia, Química Orgânica, Microbiologia, Bacteriologia e Química Analítica foram relevantes para a realização dos PIF's com sucesso, por exemplo na parte do perfil toxicológico, em determinados ingredientes não existiam dados concretos e através do conhecimento de determinadas estruturas químicas, adquirido em Química Orgânica, foi possível extrapolar dados de outros compostos.

## **AMEAÇAS**

### **Área de medicamentos de Uso Humano**

Apesar de ter sido um estágio muito enriquecedor a nível de produtos cosméticos, sinto que ficou em falta abordar os medicamentos propriamente ditos para que a minha formação em assuntos regulamentares ficasse ainda mais completa. Esta empresa não trabalha com medicamentos e assim sendo não tive contacto com as legislações sobre os mesmos nem *Common Technical Documents* (CTD's), matérias que considero importantes na formação de um farmacêutico que enverga um estágio em indústria farmacêutica ou assuntos regulamentares.

### **Pobre abordagem de determinados conteúdos durante o MICF**

Durante os cinco anos de curso não tive contacto com legislações e normas de produtos cosméticos, nomeadamente o Regulamento (CE) n.º 1223/2009 e o Decreto-Lei n.º 189/2008. O primeiro contacto, como suprarreferido, foi na formação dada pelo Dr. David e inicialmente senti dificuldade em me adaptar à sua constante utilização.

Para além deste fator, a unidade de Assuntos Regulamentares foi crucial para a realização das minhas tarefas, mas é especialmente direcionada para medicamentos deixando de parte os produtos cosméticos. Em Dermofarmácia e Cosmética, sendo uma cadeira especializada em produtos cosméticos sinto que deveria abordar estas legislações essenciais à legalização de um produto quer em Portugal quer na União Europeia e deveria igualmente dar uma noção geral do que é um PIF e uma avaliação de rotulagem, pois se não fosse a mais-valia de ter estagiado na BasePoint estes termos continuariam a ser lacunas no meu conhecimento farmacêutico.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Ao profissional de saúde, nomeadamente ao farmacêutico são reconhecidas competências técnicas e científicas que lhe permite desempenhar funções em diversas áreas de saúde. A área de Assuntos Regulamentares integra uma das várias funções reconhecidas, sendo que, no que se refere diretamente aos produtos cosméticos, as qualificações do farmacêutico são tidas como suficientes para envergar nesse domínio.

Apesar de ao longo do curso não ser possível abordar e adquirir competências que integrem todas as saídas profissionais exequíveis, é permitido estagiar em diferentes áreas que suscitem interesse e confirmar se as expectativas correspondem à realidade do mercado de trabalho.

A realização deste estágio foi deveras enriquecedora e importante para a minha formação, contribuindo para que no futuro possa ter uma melhor prestação no mercado de trabalho. Além disso, a BasePoint encontra-se em fase de crescimento, pelo que a minha experiência foi muito mais completa e abrangente, bem como as premissas de aprendizagem constante e competência ao mais alto nível nas tarefas realizadas também se começaram a refletir no meu trabalho. Devido à necessidade de inovação, forte competitividade no mercado, ao aumento da exigência regulamentar e da vigilância por parte das autoridades regulamentares, acredito que estes estágios terão cada vez mais um papel fundamental para os estudantes finalistas.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA**

1. **BasePoint Consulting Services.** BasePoint. [Acedido: 8 de fevereiro 2020]  
Disponível em: <https://bpcs.pt>
2. **UNIÃO EUROPEIA - Regulamento (CE) n.º 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de novembro de 2009 relativo aos produtos cosméticos.** . L 342. 30 de 11 de 2009, Jornal Oficial da União Europeia, Vol. L 342, pp. 59-209.
3. **UNIÃO EUROPEIA - Decisão de Execução da Comissão relativa a orientações para aplicação do anexo I do Regulamento (CE) n.º 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo aos produtos cosméticos. 25 de 11 de 2013,** Jornal Oficial da União Europeia, Vol. L 315.

# **PARTE II**

## **RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA**

**Farmácia da Estação**

**GUARDA**

Sob orientação do Dr. Nuno José Canedo Linhares de Castro



UNIVERSIDADE D  
**COIMBRA**

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**COVID:** Doença do coronavírus

**FEG:** Farmácia da Estação da Guarda

**INFARMED, IP:** Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

**IPO:** Instituto Português de Oncologia

**MNSRM:** Medicamento não sujeito a receita médica

**MSRM:** Medicamento sujeito a receita médica

**SWOT:** *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*

## NOTAS INTRODUTÓRIAS

O estágio curricular em farmácia comunitária é de caráter obrigatório e reflete o culminar de 5 anos de aprendizagem e o primeiro impacto com a realidade profissional de um farmacêutico. Tem como objetivo desenvolver capacidades de comunicação e de interação com o utente, competências essenciais no quotidiano de um farmacêutico em contexto de farmácia comunitária.

A relação entre o farmacêutico e o utente é, na maior parte do tempo, baseada na confiança que o utente deposita no farmacêutico enquanto profissional de saúde, o que torna o exercício da profissão uma tarefa de responsabilidade sublime e, muitas das vezes, o primeiro acesso a cuidados de saúde.

Durante a semana de 11 a 16 de maio tive uma breve passagem pela Farmácia Machado em Coimbra e a partir de 18 de maio até 21 de agosto de 2020, decidi realizar este estágio na Farmácia da Estação, na cidade da Guarda.

O presente relatório tem como objetivos finais uma reflexão sobre esta experiência e uma análise SWOT identificativa dos Pontos Fortes (*Strengths*), Pontos Fracos (*Weaknesses*), Oportunidades (*Opportunities*) e Ameaças (*Threats*) que encontrei ao longo do período de estágio.

## **A FARMÁCIA MACHADO**

Na semana de 11 de maio iniciei o estágio de farmácia comunitária na Farmácia Machado, em Coimbra, mas pedi transferência para a minha área de residência, na qual iniciei dia 18 de maio.

Na Farmácia Machado vi apenas como se faz a receção de encomendas e por ser uma farmácia perto do Instituto Português de Oncologia (IPO) de Coimbra existe grande saída de psicotrópicos como por exemplo o Abstral<sup>®</sup> (fentanilo) e tem um protocolo com a Liga Portuguesa Contra o Cancro em que o pagamento dos medicamentos dos doentes oncológicos é feito quase ou na totalidade pela Liga Portuguesa contra o Cancro quando estes doentes têm dificuldades monetárias.

## **A FARMÁCIA DA ESTAÇÃO**

A Farmácia da Estação (FEG), pertence ao grupo maisfarmácias, está localizada na Avenida de São Miguel n°42 e n°46, na Guarda e como se encontra perto de uma entrada da cidade é visitada por utentes residentes e das aldeias mais próximas. Inicialmente tinha morada em Famalicão da Serra, em 2011 foi transferida para a cidade da Guarda e em Famalicão ficou a funcionar uma parafarmácia pertencente à FEG.

A equipa é constituída pelo diretor técnico, o Dr. Nuno Linhares de Castro, responsável pela farmácia e orientador do meu estágio, pela Dra. Diana Tavares, farmacêutica adjunta, duas técnicas auxiliares Helena Almeida e Miguela Gonçalves que está em Famalicão e duas técnicas de farmácia, a Beatriz Pissarra e a Márcia Parada.

## ANÁLISE SWOT

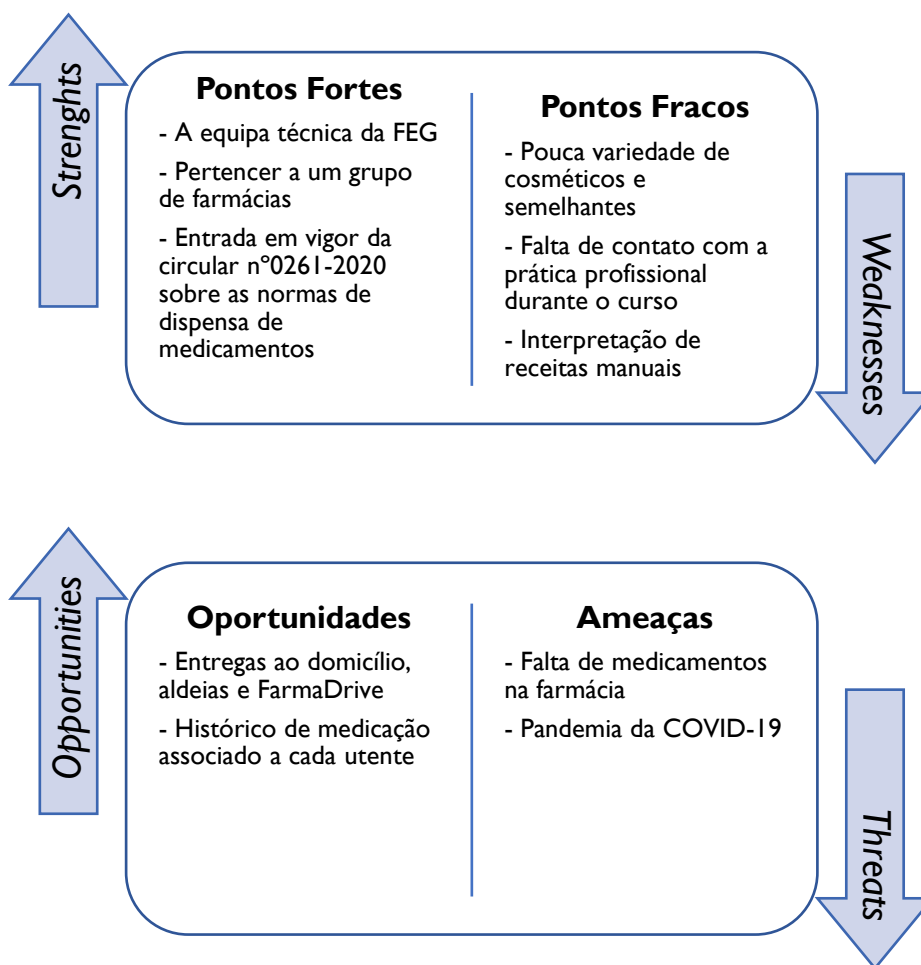


Figura 1 – Análise SWOT referente ao estágio na Farmácia da Estação da Guarda.

### PONTOS FORTES

#### A equipa técnica da FEG

Desde primeiro ao último dia de estágio, senti-me sempre integrada e apoiada por uma equipa fantástica pronta a ensinar e ajudar em qualquer situação, todas as dúvidas que surgiram foram esclarecidas na hora tanto pelas técnicas como pelo Dr. Nuno. Toda a equipa funciona com uma dinâmica de trabalho incrível que permite uma maior organização e gestão da farmácia e um atendimento ao público de excelência.



Tudo isto contribuiu para que o meu estágio corresse da melhor maneira possível com uma adaptação fácil e rápida ao funcionamento e dinâmica da farmácia e tanto a nível pessoal como profissional foi muito enriquecedor e sinto que tirei o melhor partido desta experiência.

### **Pertencer a um grupo de farmácias**

A Farmácia da Estação pertence ao grupo maisfarmácias, que é “*uma empresa de consultoria e prestação de serviços que procura maximizar o potencial de vendas de cada uma das suas farmácias, obtendo economias de escala pela centralização de atividades como a compra, a negociação e os serviços.*” (1)

No caso da FEG o armazém de preferência é a *Alliance Healthcare*, uma vez que o grupo tem descontos ao comprar em grandes quantidades sai mais rentável para todas as farmácias pertencentes, quer medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM), medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM), cosméticos e outros produtos vendidos em farmácia, permitindo-lhes alcançar margens maiores na compra e venda de determinados produtos.

Para além disso, previamente ao início de uma campanha são enviadas *newsletters* para o *e-mail* da farmácia onde estão referidos os produtos envolvidos e o seu mecanismo de ação. Muitas vezes, eram enviadas algumas amostras dos mesmos, permitindo experimentar o produto e, por isso, fazer um aconselhamento futuro mais específico e melhorado.

### **Entrada em vigor da circular nº0261-2020 sobre as normas de dispensa de medicamentos**

A partir do dia 3 de agosto de 2020 entrou em vigor uma circular que veio alterar as Normas de Dispensa de medicamentos por via eletrónica. **(Anexo I)** Apenas passa a ser possível dispensar duas embalagens de cada medicamento ou quatro no caso de doses unitárias, presentes na receita eletrónica, salvo determinadas exceções que devem ser devidamente justificadas. As justificações possíveis são apenas quatro, nomeadamente, as duas embalagens cedidas são insuficientes para todo o mês, extravio, perda ou roubo dos medicamentos, caso o utente tenha dificuldades em se deslocar à farmácia ou ausência prolongada do país. Esta norma veio limitar a acumulação de medicamentos em casa por parte dos utentes e evita assim o desperdício, uma vez que a maior parte das pessoas quando se dirige à farmácia para levantar uma receita quer levar tudo de uma só vez por uma questão de comodismo ou por medo que falte na farmácia na altura em que necessita e muitos desses

medicamentos acabam no valormed ou no lixo em embalagens intactas fora do prazo de validade.

Esta situação permitiu-me explicar a todos os utentes a importância de evitar o desperdício causado pela acumulação de medicamentos em casa que passam a validade sem serem utilizados e consciencializar civicamente para o facto de alguns medicamentos que têm um *stock* limitado nos armazenistas vão também chegar em quantidades limitadas à farmácia e que muitas das vezes ao serem levantadas todas as caixas do mesmo medicamento de uma só vez, sem necessidade, a pessoa que vem posteriormente pode precisar mesmo de uma embalagem e não haver disponível.

## **PONTOS FRACOS**

### **Pouca variedade de cosméticos e semelhantes**

Como suprarreferido, uma vez que é uma farmácia se encontra perto de uma entrada da cidade é frequentada especialmente por classes idosas de aldeias do conselho, assim sendo são privilegiadas as vendas de MSRM e os cosméticos ficam mais de parte, não havendo necessidade de uma grande variedade, porque não têm quase saída para esta população. A maior parte das vezes que alguém procura, por exemplo, um protetor solar ou um creme para o rosto, há necessidade de encomendar especialmente para a pessoa ou muitas acabam por ir à concorrência com mais opções de escolha.

A área de dermofarmácia e cosmética ficou ainda com algumas arestas a limar em comparação com outros produtos e MNSRM nos quais tive menos dificuldade em fazer um aconselhamento farmacêutico assertivo.

### **Falta de contato com a prática profissional durante o curso**

O curso de Ciências Farmacêuticas é em grande parte do tempo teórico, não permitindo o contato, que considero necessário, com a prática profissional no contexto de farmácia comunitária. Para conseguir assimilar todo o conhecimento essencial nesta profissão seriam necessárias mais horas de estágio repartidas pelos cinco anos e não concentradas em 670 ou 810 horas no último semestre do curso.

## **Interpretação de receitas manuais**

Atualmente, as receitas manuais são menos frequentes em farmácia, só podendo ser emitidas em determinadas situações específicas, nomeadamente, inadaptação fundamentada do prescriptor, prescrição ao domicílio, falência do sistema informático ou outras situações em que podem ser prescritas até um máximo de 40 receitas médicas por mês tal como indicado na Portaria n.º 137-A/2012, de 11 de maio publicado em Diário da República. (2)

Quando apareciam receitas deste género as dificuldades na interpretação do que se encontrava escrito eram notórias, relacionando-se com a caligrafia do prescriptor. Nestas receitas estamos mais sujeitos a cometer erros e por isso tentei sempre certificar com o resto da equipa não só o que estava prescrito, mas também os planos de participação. Este tipo de receita tem determinados requisitos que precisa cumprir para que a farmácia receba a participação dos medicamentos, nomeadamente só podem ser prescritas, no máximo, duas caixas de cada medicamento e o número total de embalagens por receitas é quatro, também sempre que seja rasurada na parte da data ou da prescrição é necessária uma assinatura do médico ou então a receita não será válida e não pode ser aviada, para além disso têm apenas um mês de validade a contar do dia da prescrição e toda a medicação tem de ser levantada ou é perdida, uma vez que não é reutilizável como as receitas eletrónicas.

## **OPORTUNIDADES**

### **Entregas ao domicílio, aldeias e FarmaDrive**

Como suprarreferido, a Farmácia da Estação, tem uma parafarmácia em Famalicão da Serra, onde os utentes podem comprar MNSRM e encomendar MSRMs através da técnica Miguela Gonçalves, que posteriormente envia as receitas para a FEG. Ao final do dia, um responsável da farmácia vai a Famalicão fazer a entrega, para os utentes poderem ir buscar à parafarmácia. Na aldeia de Valhelhas as entregas são feitas às quartas-feiras pelo Dr. Nuno em casa de cada pessoa.

Esta dinâmica, permitiu-me um grande contacto com diversas receitas manuais e eletrónicas de doentes idosos com várias doenças crónicas e polimedicados dessas aldeias na fase de preparação dos sacos para a entrega.

Há ainda a possibilidade, dentro da cidade da Guarda, de entregas ao domicílio, o que torna mais cómodo e seguro, especialmente para pessoas com deficiências motoras e com dificuldades de deslocação até à farmácia. Existe também na FEG o sistema de FarmaDrive,

único na cidade, onde as pessoas vão pela garagem em vez de entrarem na farmácia evitando filas e possíveis contágios nesta época de pandemia.

### **Histórico de medicação associado a cada utente**

A FEG, ao longo do tempo vai fidelizando muitos utentes, deslocando-se estes unicamente a esta farmácia para levantar as receitas, especialmente idosos das aldeias próximas e utentes que residem nas imediações da farmácia. Desta maneira, a equipa da FEG conhece a maioria dos seus utentes, muitas vezes sabendo de memória quais são os medicamentos que cada um costuma consumir. Assim sendo, consultando o registo das vendas anteriores é possível saber o laboratório, no caso de medicamentos genéricos, ou a marca que o utente habitualmente leva. Esta é uma ferramenta fundamental no acompanhamento farmacêutico, tendo uma importância considerável quando o utente se desloca para adquirir MNSRM ou um novo MSRM prescrito, é possível recorrer ao histórico e verificar se não existe nenhuma interação medicamentosa ou se o medicamento que este deseja levar não é contraindicado na sua condição patológica. Surge assim como uma oportunidade de pôr em prática conhecimentos técnicos e científicos visto que na FEG existem muitos utentes polimedicados, e através da consulta do histórico foi-me possível aconselhar corretamente e evitar possíveis interações medicamentosas graves.

## **AMEAÇAS**

### **Falta de medicamentos na farmácia**

A insuficiência ou falta de alguns medicamentos em *stock* foi uma realidade que me acompanhou durante todo o estágio, como por exemplo o Victan<sup>®</sup>, todos os dias várias pessoas recorriam à farmácia com receita deste medicamento na esperança de conseguirmos arranjar através de algum armazém de distribuição grossista, estando este esgotado e só com início de produção prevista para outubro deste ano.

O problema concentra-se especialmente no facto de muitas empresas farmacêuticas racionarem o fornecimento de medicamentos para o mercado português, contrariamente ao que acontece com a exportação paralela para países da Europa onde os preços são substancialmente superiores, levando à rutura sistemática dos *stocks* de muitos deles em Portugal. Por conseguinte, os armazéns de distribuição grossista recorrem à exportação de uma percentagem desses medicamentos de forma estratégica, através da qual conseguem

obter maiores margens de lucro, enquanto que em território português fornecem, preferencialmente, farmácias com maior capacidade de faturação, rateando o aprovisionamento de medicamentos a farmácias cuja capacidade de faturação seja menor.

Consequentemente, existe um decréscimo da confiança por parte dos utentes em relação à farmácia, que a longo termo poderá quebrar a sua fidelização com a mesma. Não são situações de resolução simples já que muitos doentes crónicos tomam um determinado medicamento e não pretendem ou não podem substituí-lo, assim sendo, pode pôr em causa o profissionalismo do farmacêutico e a boa imagem da farmácia.

### **Pandemia da COVID-19**

Dia 2 de março de 2020 testou positivo o primeiro doente com COVID-19 em Portugal. A partir daí várias foram as mudanças que ocorreram no nosso país em todos os setores. As farmácias restringiram a entrada de pessoas e muitas delas começaram a atender no postigo, o que originou filas infindáveis e utentes descontentes com o tempo de espera. Houve também um grande aumento no preço de determinados produtos que se tornaram essenciais no dia a dia dos portugueses como por exemplo, o álcool gel, as luvas e as máscaras, que antes da COVID custavam cerca de 30 a 50 cêntimos e durante o pico da pandemia passou para mais do quadruplo chegando aos 2,5€ cada máscara e a discrepância de preços entre farmácias era notória sendo este fator comentado por vários utentes diariamente.

Para controlar estes preços elevados e díspares foi imposto um limite máximo de margem de lucro de 15% sobre o preço pago pelas farmácias aos fornecedores em relação a estes produtos fiscalizado pelo Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. (INFARMED, IP). Muitos destes produtos permaneceram esgotados durante bastante tempo e as mudanças de preço quase diárias obrigavam as pessoas, mesmo as fidelizadas na FEG, a ir a outras farmácias, colocando sempre a culpa no farmacêutico ou no técnico que estava a fazer o atendimento.

### **CASO PRÁTICO**

Um utente, com cerca de 35 anos, dirige-se à farmácia com um quadro de diarreia e pede um Imodium Rapid® para que esta passe o mais rápido possível.

Após questionar quando começou esse episódio, se é intolerante a algum tipo de alimento, se tem febre, sangue ou muco nas fezes, dores abdominais intensas ou vômitos, o

utente disse que na noite passada esteve nas urgências do hospital com febre, tosse e dificuldade em respirar e que foi diagnosticado com uma infecção pulmonar e está a tomar azitromicina 500mg durante 3 dias.

Posto isto, informei o utente que distúrbios gastrointestinais como a diarreia são um dos efeitos secundários mais frequentes durante a toma de antibióticos, especialmente da azitromicina, uma vez que estes desregulam a flora intestinal e assim sendo o Imodium não seria aconselhável nesta situação.

Sugeri como alternativa ao que o utente tinha pedido, o Prolif<sup>®</sup>, que contém *Saccharomyces boulardii* e está indicado no tratamento de casos de diarreia aguda e prevenção de diarreia associada à toma de antibióticos, uma vez que vai ajudar a regular a flora intestinal.

Reforcei ainda a ideia de que não deveria parar a toma do antibiótico e deveria adotar medidas não farmacológicas adicionais essenciais como a ingestão de líquidos para reidratar o organismo, fazer uma dieta leve e de fácil digestão como maçã, pera, cenoura, arroz e frango cozidos e evitar comer alimentos ricos em gorduras ou fibras, refrigerantes e bebidas alcoólicas.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Concluído o meu estágio em farmácia comunitária, posso afirmar que ser farmacêutico não passa apenas por ter grande conhecimento científico nas áreas relacionadas com o medicamento, mas também por conseguir interagir e expressar claramente aquilo que se quer explicar de modo a evitar gerar conflitos com os utentes ou até mesmo com os colegas de trabalho, aumentando assim as competências de interação interpessoal. Noções de *marketing*, gestão comercial, organização e responsabilidade são aspetos relevantes que foram melhorados durante todo o estágio e que se mostram importantes para a gestão e subsistência de uma farmácia no mercado.

Durante todo o curso adquiri os conhecimentos teóricos necessários que me permitiram desenvolver competências para pôr em prática durante todo o meu estágio e que se vão prolongar ao longo da minha carreira profissional. Posto isto, ao considerar que a prática é fundamental, a componente teórica só faz sentido quando inter-relacionada com esta e o estágio de fim de curso é crucial para essa inter-relação acontecer e nos formarmos mestres em ciências farmacêuticas com bases sólidas do nosso papel como profissionais de saúde que somos.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

1. **maisfarmacias.** [Acedido: 10 de julho 2020] Disponível em: <https://www.maisfarmacia.org/>
2. **Portaria n.º 137-A/2012.** MINISTÉRIO DA SAÚDE. 11 de maio de 2012, *Diário da República.*

# **PARTE III**

## **Monografia**

### **Células T CAR e novas abordagens terapêuticas: terapia combinada com vírus oncolíticos e células NK**

Sob orientação do Professor Doutor Sérgio Paulo Magalhães Simões



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



## LISTA DE ABREVIATURAS

**ACT:** Terapia celular adotiva

**Ad:** Adenovírus

**Ad5Δ24:** Adenovírus oncolítico serotipo 5 armado

**BCMA:** Antígeno de maturação das células B

**CAR:** Recetor de antígeno quimérico

**CCL5/RANTES:** Ligante 5 da quimiocina C-C

**CD:** Cluster de diferenciação

**CE:** Comissão Europeia

**CRS:** Síndrome de libertação de citocinas

**DAMPs:** Padrões moleculares associados a danos celulares

**DC:** Célula dendrítica

**DLBCL:** Linfoma difuso de grandes células B refratário

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**DNAM-1:** Molécula acessória DNAX-1

**EGFR vIII:** Variante III do recetor do fator de crescimento epidérmico

**EGFR:** Recetor do fator de crescimento epidérmico

**ERBB2/HER2:** Recetor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano

**FDA:** *Food and Drug Administration*

**GM-CSF:** Fator estimulador de colónias de macrófagos e granulócitos

**GVHD:** Doença do enxerto contra o hospedeiro

**hESCs:** Células estaminais embrionárias humanas

**HIV:** Vírus da imunodeficiência humana

**ICD:** Morte celular imunogénica

**IFN- $\gamma$ :** Interferão gama

**IgG<sub>1</sub>:** Imunoglobulina G<sub>1</sub>

**IL:** Interleucina

**IL13R $\alpha$ 2:** Recetor alfa 2 da interleucina-13

**IL-2R $\beta$ :** Recetor  $\beta$  da interleucina-2

**iPCs:** Células estaminais pluripotentes induzidas

**ITAMs:** Sequências de ativação ricas em tirosina

**JAK:** Cinase *Janus*

**LDH:** Lactato desidrogenase

**LLA:** Leucemia linfoblástica aguda

**MHC:** Complexo principal de histocompatibilidade  
**NK:** *Natural killer*  
**NKG2D:** Grupo 2D de *natural killer*  
**NKp:** Recetor de ativação NKp  
**OGM:** Organismo geneticamente modificado  
**ORR:** Taxa de resposta global  
**OV:** Vírus oncolíticos  
**PAMPs:** Padrões moleculares associados a patógenos  
**PB:** Sangue periférico  
**RNA:** Ácido ribonucleico  
**scFv:** Fragmento variável de cadeia simples  
**SIDA:** Síndrome da imunodeficiência adquirida  
**STAT3/5:** Transdutores de sinal e ativadores da transcrição 3 e 5  
**TAA:** Antígeno associado ao tumor  
**TCR:** Recetor de células T  
**TME:** Microambiente tumoral  
**TNF- $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral alfa  
**TRUCK:** Células T CAR redirecionadas para a morte universal de citocinas  
**T-VEC:** Talimogene laherparepvec  
**UCB:** Sangue do cordão umbilical  
**UE:** União Europeia

## RESUMO

A capacidade de as células imunológicas atingirem e eliminarem organismos infecciosos e invasores é estudada há várias décadas. As terapias com células adotivas que expressam recetores de antigénio quiméricos (CAR) geraram muito interesse e investimento nos últimos anos devido aos resultados clínicos sem precedentes. No entanto, a natureza autóloga (específica do paciente) dessa terapia celular, os complexos processos de produção e o risco de doença do enxerto contra o hospedeiro (*graft versus host disease* (GVHD)) suscitaram preocupações sobre o seu custo e segurança.

Da mesma forma, a obtenção de linfócitos suficientes de um doente, muitas vezes com linfodepleção pode representar uma barreira para garantir quantidades clinicamente relevantes de células T CAR. Devido a essas limitações, os investigadores estão a estudar os vírus oncolíticos em terapia combinada, especialmente o adenovírus (Ad) e as células *natural killer* (NK) como alternativas viáveis e que ofereçam mais segurança, resultados positivos e menos efeitos indesejáveis nos pacientes.

**Palavras-chave:** terapia celular adotiva, células T CAR, tumores sólidos, vírus oncolíticos, células CAR-NK.

## **ABSTRACT**

The ability of immune cells to target and eliminate infectious and invading organisms has been studied for several decades. Adoptive cell therapies that express chimeric antigen receptors (CAR) have generated a lot of interest and investment in recent years due to unprecedented clinical results. However, the autologous (patient-specific) nature of this cell therapy, the complex production processes and the risk of graft versus host disease (GVHD) raised concerns about its cost and safety.

Likewise, obtaining enough lymphocytes from a sick person, often with lymphodepletion, can represent a barrier to ensure clinically relevant amounts of CAR-T cells. Because of these limitations, researchers are studying oncolytic viruses in combination therapy, especially adenovirus (Ad) and natural killer cells (NK) as viable alternatives that offer higher safety, improved efficacy and less undesirable effects on patients.

**Keywords:** Adoptive cell therapy, CAR T cells, solid tumors, oncolytic viruses, CAR-NK cells.

## I. INTRODUÇÃO

O campo da oncologia foi revolucionado pelo surgimento de imunoterapias celulares que aproveitam e aumentam a capacidade natural do sistema imunológico para combater o cancro. Como essa capacidade é frequentemente prejudicada e diminuída em pacientes oncológicos, uma abordagem promissora é reforçar diretamente as respostas imunológicas endógenas deficientes com terapia de células T adotiva, que envolve a infusão passiva de linfócitos autólogos expandidos e ativados *ex vivo* contra antígenos associados a tumores (TAA). (1) Para alguns tipos de cancro, como o melanoma, a imunoterapia já substituiu alguns dos tratamentos convencionais, como é o caso da quimioterapia. Todavia, para outros tipos de cancro, irá provavelmente constituir uma alternativa terapêutica, não substituindo totalmente as terapêuticas-alvo convencionais. (2)

A terapia com células T CAR fez progressos significativos no tratamento de neoplasias de células B, mas o sucesso em tumores sólidos, incluindo os cerebrais, tem sido limitado. As estratégias atuais para o desenvolvimento da terapêutica celular T CAR para tumores sólidos estão focadas na seleção de alvos ideais, na engenharia de células CAR multiespecíficas ou na terapia combinada com vírus oncolíticos, nomeadamente o adenovírus, para superar a heterogeneidade antigénica, aumentando a potência das respostas das células T para amenizar o microambiente tumoral (TME) supressor e a exaustão das células T, criando novas abordagens para superar as limitações no tráfego de células T tumorais. (3) Atualmente, esta terapia não é universal, uma vez que estão presentes recetores específicos de células T do paciente e para evitar uma reação do enxerto contra o hospedeiro, as células T CAR devem ser obtidas através do sangue do mesmo. O transplante autólogo é caro, complexo e por vezes é um processo de transferência inseguro. Para além disso, as células T CAR ativadas secretam um conjunto de citocinas pró-inflamatórias potentes que sob determinadas circunstâncias causam hipercitocinémia e neurotoxicidade e uma vez que as células T CAR proliferam, a sua população pode permanecer no corpo do paciente por vários anos. Por um lado, esta situação leva a que não seja necessária nova administração e as células garantem uma atividade antitumoral a longo prazo, mas por outro lado em caso de atividade inapropriada ou *off-target* das células T CAR, as células saudáveis podem ser destruídas. (4) Dadas as várias limitações desta terapêutica estão também a ser estudadas as células CAR-NK alogénicas como solução alternativa de modo a aumentar os resultados positivos e diminuir as desvantagens e custos associados.

## II. TERAPIA CELULAR ADOTIVA: CÉLULAS T CAR

A capacidade de converter células imunes autólogas ou alogénicas em fármacos vivos, que atacam especificamente células malignas tem por base a moderna terapia celular adotiva (ACT) que permite que o sistema imunológico adaptativo identifique e destrua seletivamente células malignas, deixando os tecidos saudáveis intactos. (1) (5) Além disso, o desenvolvimento natural de células de memória permite o estabelecimento de imunidade antitumoral duradoura e proteção contra a recorrência do tumor. (6)

### Contextualização histórica das células T CAR

Em 1987, um imunologista israelita, *Zelig Eshhar*, do *Weizmann Institute of Science*, criou o primeiro recetor quimérico de antigénio, um recetor modificado que não existe na natureza. (7)

A adição de domínios co-estimuladores para melhorar a potência da sinalização do CAR foi desenvolvida por *Michel Sadelain*, dando origem a construções de CAR de segunda e terceira gerações. Posteriormente foram cruzados os trabalhos desenvolvidos por vários investigadores, associando a transferência celular adotiva às células T CAR e essa associação foi premiada com o *Massry Prize* em 2014. (7) (8) (9)

A 30 de agosto de 2017, o *tisagenlecleucel* (*Kymriah*<sup>®</sup>) foi a primeira imunoterapia com células T CAR aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) e mais tarde pela Agência Europeia do Medicamento, para crianças e jovens adultos com idade inferior a 25 anos que tiveram reincidência ou não estavam a responder à terapia para leucemia linfoblástica aguda (LLA). Mais tarde, a 18 de outubro de 2017, a FDA aprovou o *axicabtagene ciloleucel* (*Yescarta*<sup>®</sup>), para pacientes com linfoma de células B grandes difuso recidivante ou refratário (DLBCL) e outros linfomas raros de células B grandes. (9) (10)

### Células T CAR

De acordo com o Regulamento (CE) n.º 1394/2007 de 13 de novembro de 2007, as células T CAR estão inseridas na subclasse de Medicamentos de Terapia Avançada e, dentro destes, são designadas por produtos de terapia genética dotados de autoproliferação e de persistência *in vivo*. (11)

Por sua vez, os CARs são recetores de antigénio sintéticos que além de dotarem as células T de especificidade semelhante a anticorpos, permitem redirecionar a citotoxicidade

destas células para um antígeno tumoral específico com maior grau de especificidade. Além disso, estes receptores independentes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) são compatíveis com pacientes de todos os subtipos de antígeno leucocitário humano e podem ser utilizados para identificar antígenos expressos na superfície das células tumorais, bem como reconhecer uma variedade de estruturas antigênicas, incluindo proteínas, carboidratos e glicolípidos. (1)

#### *Domínios das células T CAR*

O receptor de antígeno quimérico é composto por quatro domínios, incluindo domínio extracelular, espaçador, transmembranar e intracelular. O domínio extracelular faz a ligação ao antígeno e é tipicamente construído a partir do fragmento variável de cadeia simples (scFv) de um anticorpo específico que é direcionado contra o antígeno alvo e por sua vez, a conexão entre o domínio de ligação ao antígeno e o domínio transmembranar depende do espaçador. (12) (13)

A forma mais simples de espaçador é a *hinge region* de uma imunoglobulina G<sub>1</sub> (IgG<sub>1</sub>) e é suficiente para a maioria das construções baseadas em scFv e influencia a flexibilidade do domínio extracelular e a função da célula T CAR. O domínio transmembranar é principalmente derivado do CD8/CD28 e afeta a expressão e a estabilidade do CAR na membrana das células T. (12) (13)

O domínio intracelular desempenha um papel central na ativação, proliferação, persistência e citotoxicidade das células T e consiste na via de sinalização CD3 que ativa a célula T após a ligação à célula alvo incluindo três sequências de ativação ricas em tirosina (ITAMs). São também aplicados domínios co-estimuladores, como CD28 e CD137, às construções de segunda e terceira gerações de células T CAR, que podem melhorar a proliferação, produção de citocinas, potência antitumoral e persistência da célula T, fornecendo a via de sinalização secundária. **(Figura 1)** (12) (13)

#### *Evolução das células T CAR*

Desde o desenvolvimento inicial dos CARs, as células T CAR podem ser divididas em cinco gerações de acordo com a estrutura do domínio intracelular. (12)

Os CARs de primeira geração consistem num domínio de sinalização simples mais comumente derivado da cadeia CD3  $\zeta$  (zeta) do complexo TCR/CD3. A ligação ao antígeno

é mediada por um domínio extracelular baseado em scFv derivado de anticorpos monoclonais, embora potencialmente qualquer ligante de uma molécula de superfície celular alvo possa ser empregue. O CAR é amarrado à membrana plasmática por meio de um domínio transmembranar e a exigência de um domínio espaçador extracelular parece depender em grande parte da localização física relativa do epítopo alvo ligado pelo scFv, uma vez que epítopos situados perto da membrana plasmática geralmente requerem um CAR com um domínio espaçador extracelular enquanto os epítopos que residem a uma distância significativa da membrana plasmática são otimamente ligados por CARs sem um domínio espaçador. (14)

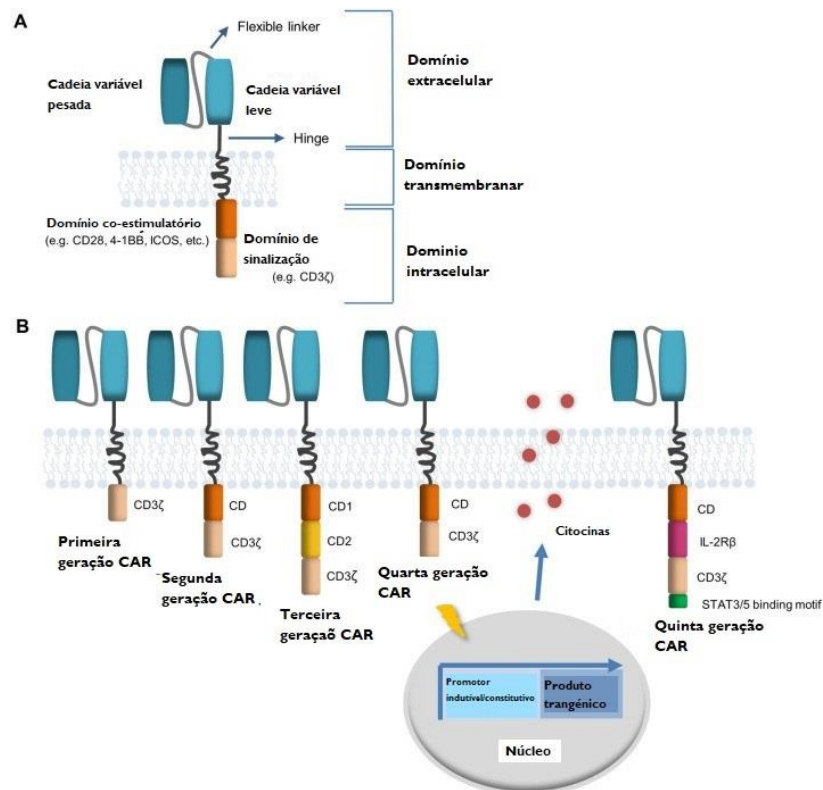
Os CARs de segunda geração incorporam um domínio de sinalização intracelular adicional à configuração básica do recetor de primeira geração que fornece um sinal co-estimulatório (por exemplo, CD28, CD137). (14)

Os recetores de terceira geração incorporam dois domínios co-estimulatórios em série com o domínio de sinalização ativador de células T. Os CARs ou TRUCKS de quarta geração empregam um vetor ou vetores que codificam um CAR e também um promotor responsivo ao CAR (por exemplo, fator nuclear de células T ativadas) que respondem após sinalização bem-sucedida do CAR pela produção transgênica de citocinas como a IL-12. Essas citocinas podem recrutar outros componentes do sistema imunológico para expandir a resposta imune antitumoral geral. **(Figura I)** (14)

Mais recentemente, foi desenvolvido um novo projeto de CAR, utilizando um *backbone* de segunda geração com um domínio citoplasmático truncado adicional do recetor  $\beta$  da IL-2 (IL-2R $\beta$ ), posicionado entre os domínios de sinalização CD3 $\zeta$  e CD28 e um STAT3 / 5 (fatores de transcrição) que liga a tirosina-XX-glutamina (YXXQ) no terminal C do CD3 $\zeta$ . (15)

Este CAR de quinta geração visa desencadear, de uma só vez, os três sinais – recetor de células T (TCR) (domínio CD3 $\zeta$ ), co-estimulador (domínio CD28) e citocina (através da ativação das vias de sinalização dos fatores de transcrição JAK e STAT3/5) - que são fisiologicamente necessários para a ativação ideal das células T, de maneira dependente do antígeno. Os investigadores demonstraram, nos modelos de tumor líquido e sólido, que a engenharia de células T CAR com genes que codificam citocinas melhorou a sua proliferação, sobrevivência e atividade antitumoral, em comparação com as células T CAR convencionais de segunda geração. **(Figura I)** (15)





**Figura 1** – Representação esquemática da estrutura do CAR e evolução das gerações CAR. (A) Constituição do CAR compreendendo um domínio de ligação extracelular derivado de um anticorpo, um domínio transmembranar e um domínio de sinalização intracelular. A estrutura representa um CAR de segunda geração. (B) Gerações de CARs desde a primeira geração até à quinta geração. Adaptado da referência (15)

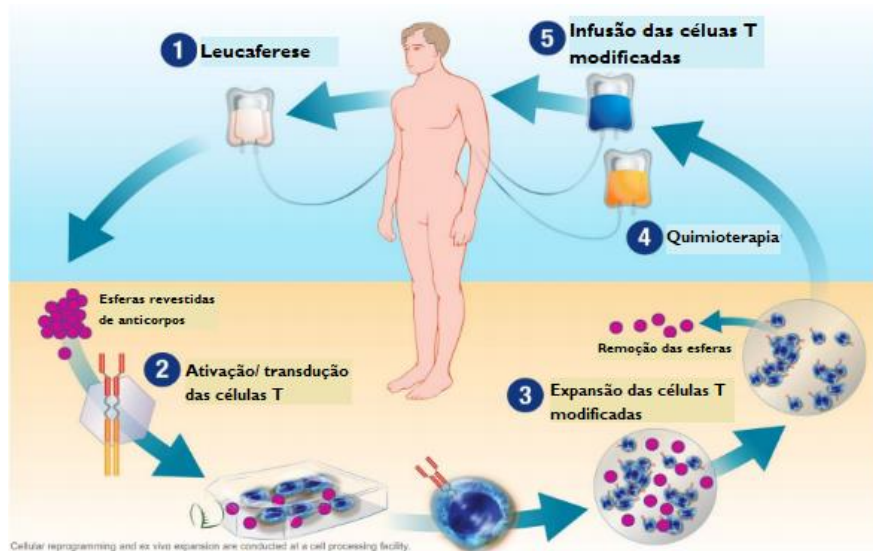
### Produção de células T CAR

A produção de células T CAR normalmente começa com a colheita de células mononucleares do sangue periférico do paciente (autólogas) utilizando um procedimento de leucaferese de grande volume. As células são então transferidas para uma instalação de processamento celular onde são carregadas com o CAR, geralmente incubando-as com vetores virais que codificam o CAR, que entram nas células T e introduzem o RNA do CAR. Esse RNA-CAR é então transcrito reversamente no DNA, que se recombina no genoma da célula T, resultando na incorporação permanente do gene CAR. (10)

Os vetores lentivirais e em menos extensão os gammaretrovirais são utilizados para a transdução do gene CAR de células T primárias. As células T modificadas pelo gene CAR são então expandidas *ex vivo*, preparadas como um produto farmacêutico para infusão intravenosa e são geralmente administradas como infusão única. (10)

O tempo médio entre a leucaferese e a administração de células T CAR é de 4 a 5 semanas e todo o processo, desde o encaminhamento à infusão, pode levar até 2 meses. Portanto, os médicos costumam realizar quimioterapia para evitar a progressão rápida da

doença e manter a condição geral do paciente durante o período de produção das células T CAR. A quimioterapia para linfodepleção, como fludarabina e ciclofosfamida, é frequentemente administrada antes da infusão das células T CAR com o objetivo de diminuir o número de células T *in vivo*, incluindo células T reguladoras e, conseqüentemente, regular positivamente citocinas como IL-7 e IL-15. Estas citocinas promovem a expansão e aumento da atividade antitumoral das células T CAR. **(Figura 2)** (10)



**Figura 2** – Processo de produção de células T CAR. Passa por cinco passos cruciais, nomeadamente, a leucaferese, ativação, transdução das células T, expansão das células T modificadas, quimioterapia e posterior infusão das células T modificadas no paciente. Adaptado da referência (16)

### Toxicidade associada às células T CAR

A aplicação de células T CAR produziu respostas antitumorais impressionantes, mas está associada a várias preocupações de segurança sobre os efeitos colaterais que podem causar, uma vez que são observadas várias toxicidades, imediatamente ou semanas após a sua infusão, o que pode representar riscos significativos. (17)

#### *On-target, on-tumor / CRS e neurotoxicidade*

Este tipo de toxicidade é geralmente aguda e está diretamente relacionado com efeitos secundários à ligação do CAR ao antígeno específico residente na célula tumoral alvo. A premissa básica da terapia T CAR é a ativação das funções efetoras das células T como resultado do envolvimento bem-sucedido do CAR, incluindo libertação de citocinas e

citotoxicidade. (18) O efeito adverso a curto prazo mais comum da terapia com células T CAR é a síndrome de libertação de citocinas (CRS), normalmente em simultâneo com neurotoxicidade. A CRS após terapia com células CD19-T CAR ocorreu em 54-91% dos pacientes, incluindo CRS grave em 8,343%. A CRS é caracterizada por dispneia grave, frequentemente associada a broncoespasmo, hipoxia, febre, arrepios, urticária, coagulopatia e derrame aparecendo 1 ou 2 horas após infusão. (17) (18)

Posteriormente ao reconhecimento do tumor CD19 +(positivo) ou das células B normais, a ativação das células T CAR resulta na proliferação, lise das células-alvo e secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN- $\gamma$ ) que podem ser associadas à evidência clínica de CRS e neurotoxicidade. (17)

A CRS também pode estar associada a algumas manifestações da síndrome de lise tumoral, como hiperuricemia, hipercalemia, hipocalcemia, hiperfosfatemia, insuficiência renal aguda, LDH elevada, insuficiência respiratória aguda e até morte. No entanto, esses sintomas parecem transitórios e reversíveis sem deficiências a longo prazo, mas com mecanismos desconhecidos. **(Tabela I)** (17)

#### *On-target, Off-tumor*

Nesta situação, a célula T CAR liga-se ao antígeno alvo que é expresso em células saudáveis não tumorais. A condução bem-sucedida das células T CAR ao encontro do CD19 leva a aplasia de células B, mas deixa intactas as células plasmáticas negativas para o CD19 e, substancialmente, células estaminais hematopoiéticas permitindo assim a restituição de células B pós terapia. No entanto, no caso de muitos tumores sólidos, o alvo do CAR pode não ser específico do tumor, mas um antígeno associado ao tumor, onde a expressão do antígeno alvo é alta e pode também estar presente em baixos níveis no tecido saudável. (18)

Neste caso, as células T CAR podem atingir esse tecido saudável que pode eventualmente pertencer a um órgão vital. (18) Um caso descrito por *Morgan et al.* (19) mostraram que a ativação de células T CAR anti-ErbB2 em tecidos saudáveis que incluíam o pulmão e o coração resultou na morte do paciente logo após a transferência adotiva. (19) Devido a esta toxicidade, a seleção do antígeno alvo é provavelmente o fator determinante mais crítico para o sucesso da terapia CAR. **(Tabela I)** (18)

### Off-target, Off-tumor

Este terceiro mecanismo potencial de toxicidade das células T CAR está relacionado com a resposta de células T não CAR à terapia. A atividade prolongada e potencialmente baixa de células T CAR pode afetar indiretamente o ambiente local, resultando em distorções das respostas celulares homeostáticas normais, que por sua vez se transformam em toxicidade. **(Tabela I)** (18)

**Tabela I** – Toxicidade possível durante a terapia com células T CAR, para o tratamento de tumores sanguíneos ou sólidos. Adaptado das referências (18) e (19)

Tipo de toxicidade	Causa	Situação associada
<b>Toxicidade on-target, on-tumor</b>	-Rápida destruição de uma grande massa tumoral. -Libertação massiva de componentes de células tumorais na circulação.	Tratamento de leucemia Tratamento de tumores sólidos (baixa toxicidade).
<b>Toxicidade on-target, off-tumor</b>	Destruição de células saudáveis que expressam o antígeno alvo específico.	Tratamento de tumores sólidos Tratamento de leucemia / linfoma (baixa toxicidade).
<b>Toxicidade off-target, off-tumor</b>	Reação inflamatória além do tecido tumoral alvo.	Independentemente da especificidade do CAR e da doença maligna.
<b>Síndrome de libertação de citocinas</b>	Libertação de níveis séricos supra-fisiológicos de citocinas pró-inflamatórias pelas células T CAR (IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ).	Tratamento de tumores hematológicos.
<b>Neurotoxicidade</b>	Encefalopatia difusa, principalmente devido ao tráfego de citocinas sistêmicas para o líquido cefalorraquidiano.	Independentemente da especificidade do CAR e da doença maligna.

### III. SUCESSO DAS CÉLULAS T CAR EM TUMORES DE CÉLULAS B

Em dezembro de 2019, existiam mais de 600 ensaios clínicos ativos, juntamente com mais de 200 estudos concluídos que investigam as células T CAR em todo o mundo. (20)

Até ao momento, a maioria das investigações clínicas de células T CAR concentrou-se em neoplasias hematológicas com a terapia T CAR direcionada ao CD19, demonstrando um sucesso impressionante. (20) O CD19 é um marcador específico da linhagem de células B, não sendo expresso noutras linhas celulares torna-se um alvo atraente para a engenharia de células T contra várias neoplasias hematológicas de células B. (13) Em vários relatos, os investigadores demonstraram até 70% a 90% de doença residual mínima negativa com remissão completa (*minimum residual disease-negative complete remissions*) em pacientes com leucemia linfoblástica aguda (LLA) avançada resistente a quimioterapia e uma remissão completa a longo prazo de cerca de 40% no linfoma difuso de grandes células B (DLBCL). (20)

Outro estudo recente utilizou células T CAR anti-CD19 em 21 pacientes com linfoma folicular refratário/recidivo e descobriu que a imunoterapia com CD19 T CAR é altamente eficaz em adultos com linfoma folicular clinicamente agressivo com remissão durável. (20)

A terapia com T CAR direcionada ao CD22 induziu uma taxa de remissão de 73% (11/15 pacientes) em pacientes com LLA de células B, alguns dos quais resistentes às células T CAR direcionadas a CD19. Além disso, um grande estudo multicêntrico de antigénio de maturação das células B-CAR (BCMA-CAR) demonstrou uma taxa de resposta global (ORR) impressionante de 85% e uma taxa de remissão completa de 45%. (20)

Dadas todas as evidências que demonstram que a terapia com T CAR é particularmente bem-sucedida no tratamento de doenças da medula óssea e leucemia, os esforços recentes também se concentraram em implementar células T CAR no tratamento de leucemia mieloide aguda, embora o progresso tenha sido prejudicado pela falta de antigénios-alvo específicos. (20)

#### **IV. CÉLULAS T CAR PARA ALÉM DAS CÉLULAS B**

Dado o sucesso em tumores líquidos, houve um grande interesse em expandir o uso da tecnologia T CAR para o tratamento de tumores sólidos como o glioblastoma, uma forma altamente agressiva de cancro cerebral primário para o qual não há cura conhecida. (1) Para além disso, os tumores sólidos representam uma proporção relativamente grande da percentagem total de cancro e a cirurgia, radioterapia e quimioterapia são os pilares das modalidades de tratamento, mas a taxa de mortalidade permanece alta para a maioria dos pacientes com doença avançada ou metastática. (19)

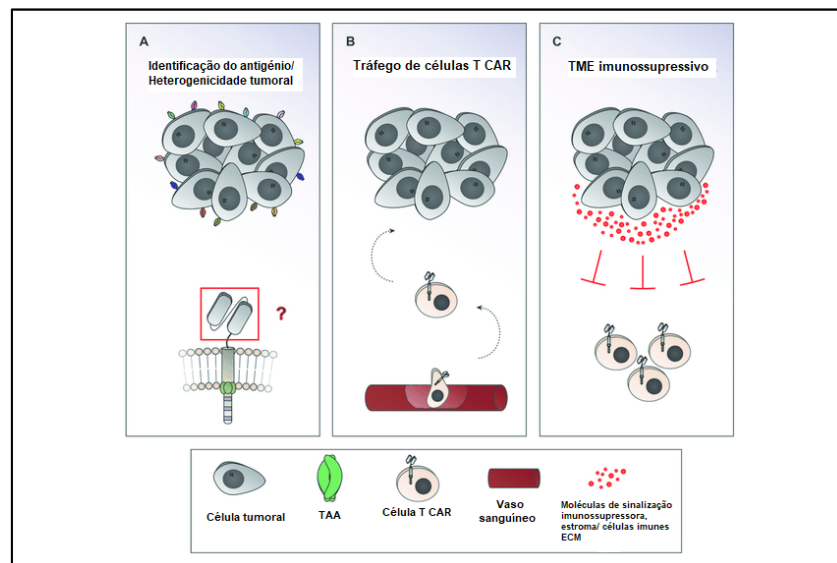
Demonstraram-se alguns sucessos recentes desta terapia em tumores sólidos nomeadamente, num estudo de fase I de escalonamento de dose, onde foram infundidas células T CAR específicas para o recetor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (Her2) em pacientes com glioblastoma progressivo e foram consideradas seguras e clinicamente eficazes, embora nenhum paciente tenha obtido resposta completa. (20)

A infusão intracraniana de T CAR direcionadas ao recetor alfa 2 da interleucina-13 (IL13R $\alpha$ 2) num paciente com glioblastoma multifocal recorrente resultou em regressão de todos os tumores intracranianos e espinhais, acompanhado por um aumento das células imunes no líquido cefalorraquidiano. (20)

Recentemente, as células T CAR contra o recetor do fator de crescimento epitelial humano VIII (EGFRVIII), uma versão mutada do EGFR encontrada em células malignas, foram utilizadas para tratar 10 pacientes com glioblastoma refratário/recidivo e demonstraram bom perfil clínico de segurança. Um dos pacientes teve doença estável residual por mais de 18 meses, com todos os pacientes a demonstrar expansão transitória detetável das células EGFRVIII-T CAR no sangue periférico. No entanto, a eficácia das células T CAR no tratamento de pacientes com tumores sólidos é limitada, apesar das boas evidências pré-clínicas de vários antígenos. (20)

### Desafios das células T CAR nos tumores sólidos

Para que este tipo de células possa eliminar eficazmente tumores sólidos, deve ter a capacidade de migrar, atravessar, proliferar e persistir nos tecidos tumorais durante o período necessário para exercer a sua ação terapêutica e conseguir identificar e destruir apenas as células que expressam o antígeno alvo dentro microambiente tumoral. (21) **(Figura 3)**



**Figura 3** – Desafios das células T CAR nos tumores sólidos. **(A)** A expressão heterogênea de TAA em tumores sólidos, bem como a expressão em tecidos saudáveis, torna difícil encontrar alvos adequados para a terapia T CAR. **(B)** Após administração intravenosa, as células T CAR precisam de migrar para o tumor e infiltrar-se. **(C)** O termo microambiente tumoral descreve a interação entre as próprias células tumorais e os vasos sanguíneos circundantes, células estromais, células imunes, bem como a matriz extracelular. A migração e expansão das células T CAR são inibidas pelo ambiente imunossupressor em tumores sólidos. Adaptado da referência (21)

Existe um conjunto de barreiras exclusivas dos tumores sólidos que impedem o sucesso da imunoterapia baseada em células T CAR, nomeadamente o microambiente

tumoral, que é caracterizado por hipoxia, pH baixo, falta de arginina ou triptofano onde se verifica uma abundância de linfócitos T reguladores, citocinas imunossupressoras, *checkpoints* imunológicos, células supressoras derivadas da linhagem mieloide e elevada heterogeneidade entre as células tumorais, levando a rápida perda de atividade funcional e eficácia terapêutica destas células. (17) (22) O conjunto destas características tumorais promove a tumorigênese e sustenta o crescimento, proliferação e invasão tumoral. (21) (22)

Os fenótipos do microambiente tumoral podem ser comumente classificados como deserto imune (*immune desert*), excluído imune (*immune-excluded*) e inflamado (*inflamed*). Os tumores inflamados têm geralmente células T secretoras de citocinas CD4<sup>+</sup> e citotóxicas CD8<sup>+</sup> e células mieloides, os desertos imunes são caracterizados por um baixo número ou ausência de células imunes infiltrantes, os excluídos imunes contêm células imunes que permanecem presas ao estroma incapazes de colonizar o TME para exercer sua função antitumoral. **(Tabela 2)** (21) (22)

**Tabela 2** – Tipos de células presentes no microambiente tumoral que dificultam a função antitumoral das células T CAR. Adaptado das referências (21) (22) (23)

<b>Tipos de células presentes no TME</b>	
<b>Células tumorais</b>	Células malignas que influenciam a composição do microambiente tumoral para garantir o seu crescimento e a sua sobrevivência.
<b>Células imunitárias que infiltram o tumor</b>	Células linfóides e mieloides que podem estimular ou inibir a resposta imunitária antitumoral.
<b>Células do estroma</b>	Células endoteliais e fibroblastos associados ao tumor, que contribuem para a sua integridade estrutural.

## **V. JUNÇÃO DE CÉLULAS T CAR A VÍRUS ONCOLÍTICOS PARA TRATAMENTO DE TUMORES SÓLIDOS**

Tal como referido anteriormente, as células T CAR têm grande dificuldade em alcançar os tecidos tumorais e serem eficazes uma vez que quando estas atingem o leito tumoral em número suficiente, existem mecanismos inibitórios associados ao tumor para interromper as respostas imunológicas. (24)

No tratamento de pequenos tumores, a infusão de células T CAR após quimioterapia ou radioterapia pode reduzir parcialmente o impacto desses mecanismos inibitórios. Uma das estratégias que está a ser estudada para combater estas dificuldades é a utilização conjunta de vírus oncolíticos e células T CAR. (24)

Os vírus são pequenas partículas que se replicam no meio intracelular das células hospedeiras e a infecção viral pode estar associada à patogenicidade subjacente e à indução da inflamação no hospedeiro. Têm sido utilizados na vacinação contra doenças infecciosas, na distribuição de genes terapêuticos para o tratamento de doenças metabólicas e degenerativas e como agentes oncolíticos no tratamento do cancro. A maioria dos vírus é constituído por três elementos estruturais principais: o genoma, que é um RNA ou DNA de cadeia simples ou dupla; a cápside, que é um revestimento proteico que envolve o material genético e em alguns vírus, existe ainda o envelope lipídico (geralmente derivado da membrana plasmática do hospedeiro), que circunda a cápside e pode facilitar a ligação do vírus às membranas celulares do hospedeiro, promovendo a entrada viral. (25)

Em meados do século XIX, vários casos mostraram regressão tumoral em pacientes submetidos a infecções virais. (26) O campo do vírus oncolítico ressurgiu no final dos anos 90 com vírus desenvolvidos geneticamente, em vez dos vírus do tipo selvagem utilizados anteriormente, embora um desses vírus, Rigvir<sup>®</sup>, tivesse sido aprovado na Letónia, Geórgia e Armênia. Pouco tempo depois, em 2005, o primeiro vírus oncolítico geneticamente modificado, Oncorine<sup>®</sup> (H101), foi aprovado pela Administração Chinesa de Alimentos e Medicamentos. Este adenovírus é desenvolvido para se replicar em células cancerígenas e está aprovado para carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. (26)

O único vírus oncolítico aprovado pela *Food and Drug Administration* e pela Agência Europeia do Medicamento é o Talimogene Laherparepvec (Imlygic)<sup>®</sup>, para melanoma metastático não ressecável. Este vírus, um herpes simplex I que codifica o fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), foi aprovado em 2015. (26)

### **Propriedades dos vírus oncolíticos**

O termo vírus oncolítico (OV) refere-se a vírus capazes de infetar, provocar lise e replicar seletivamente em células cancerígenas e deixar as células normais ilesas. (24) (26)

Como produtos bioterapêuticos replicativos, os OVs podem ser administrados sistemicamente ou localmente e, portanto, têm o potencial de atuar em locais de tumor primário e metastático. Embora tenham sido desenvolvidas várias estratégias de direcionamento de OV, o princípio de *XYgllb* comum é atenuar ou excluir fatores de virulência, de modo a que o OV seja incapaz de se replicar em tecidos normais e ainda retenha a capacidade de se replicar dentro das células cancerígenas conduzindo à sua morte. (27)



A seleção de vírus oncolíticos para imunoterapia contra o cancro depende de muitos fatores, incluindo o potencial de patogenicidade, imunogenicidade, tropismo tumoral, capacidade de codificar transgenes terapêuticos, títulos virais alcançáveis durante a produção, estabilidade viral, espécie viral, dose, via de administração e imunidade pré-existente do hospedeiro para promover imunidade antitumoral eficaz. (25)

O ciclo de vida dos vírus líticos descreve a fase ativa da infecção e replicação viral nas células hospedeiras e é constituído por cinco fases distintas - fixação, penetração e remoção do revestimento, síntese, montagem e libertação - que podem ser reguladas por manipulação genética do genoma viral e servir como um método fisiologicamente relevante para direcionar a replicação viral e eliminar as células tumorais. (25)

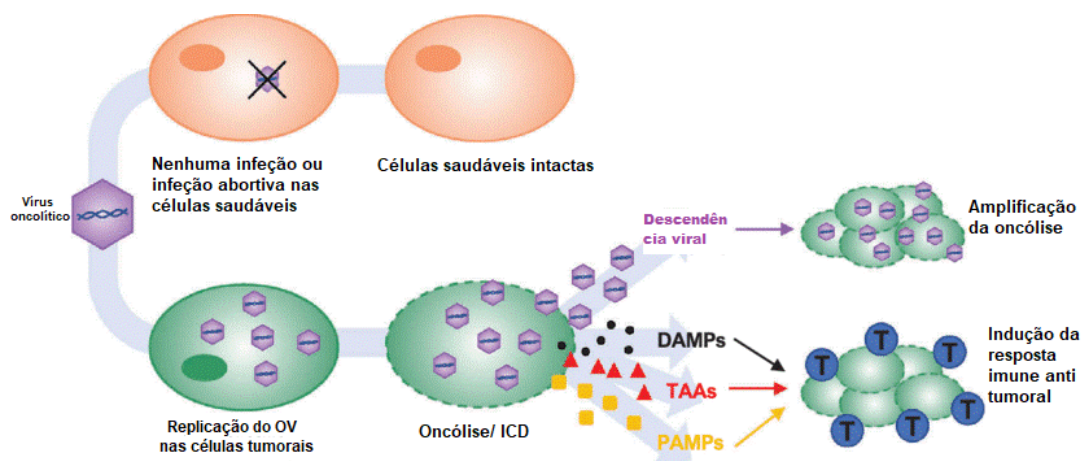
### **Vírus oncolíticos como imunoterapia**

Os OV's têm como alvo preferencial as células cancerígenas, tendo efeitos mínimos ou nulos nas células normais e medeiam a destruição das células tumorais por dois mecanismos principais: a lise direta das células infetadas (oncólise) e o aumento indireto da imunidade antitumoral do hospedeiro. São capazes de infetar e se replicar nas células cancerígenas, induzindo a lise das células tumorais e libertando a descendência viral infecciosa que se espalha para as células tumorais circundantes (amplificação da oncólise). (28)

A oncólise também liberta antígenos associados a tumores, padrões moleculares associados a danos celulares (DAMPs) e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) num processo altamente inflamatório, denominado morte celular imunogénica (ICD) que inclui piroptose, necroptose, apoptose imunogénica e morte celular autofágica. A ICD causa exposição ou libertação de DAMPs e PAMPs como sinais de perigo, juntamente com antígenos associados a tumores. Os DAMPs atraem células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas (DCs) que “engolem” os TAAs e recebem sinais de maturação. Os DAMPs também induzem as DCs a produzir citocinas pró-inflamatórias e as DCs maduras apresentam TAAs a células T naive, iniciando respostas imunes específicas para o antígeno que mediam a destruição direcionada de células tumorais. (28)

A deteção celular da infecção viral e os produtos da oncólise desencadeiam a rápida ativação de uma resposta imune antitumoral no hospedeiro. O reconhecimento direto e a morte de células tumorais são mediados principalmente por células *natural killer* do sistema imunológico inato e por linfócitos T citotóxicos CD8 + específicos para antígenos tumorais do sistema imunológico adaptativo. **(Figura 4)** (28)

Também são capazes de desencadear uma ativação imune antiviral nas células tumorais, mesmo sem replicação produtiva, que ajuda a ativar a estimulação imune antitumoral. Os PAMPs ativam uma cascata de eventos de sinalização que estimulam o inflamassoma e ativam diferentes fatores de transcrição, culminando na liberação de citocinas pró-inflamatórias e DAMPs. Essas citocinas pró-inflamatórias alteram o equilíbrio de fatores pró e anti-inflamatórios no microambiente tumoral, responsável pelo seu estado imunossupressor. Além de neutralizarem a imunossupressão induzida pelo tumor, esses compostos medeiam o recrutamento de células imunes libertadoras de citocinas com função efetora adicional, ampliando a imunidade antitumoral do hospedeiro. Além disso, as células cancerígenas infectadas por OV processam e apresentam antígenos específicos de vírus à superfície, facilitando a sua identificação e destruição por células T antivirais. Assim, a estimulação imune antiviral desencadeada pelos PAMPs e os antígenos virais potencializam a resposta imune antitumoral. **(Figura.4)** (28)



**Figura 4** – Modo duplo de ação de vírus oncolíticos (OVs). Têm como alvo preferencial as células cancerígenas, enquanto produzem efeitos mínimos ou não prejudiciais nas células normais, tendo em conta as diferenças bioquímicas entre células saudáveis e células mutadas. Adaptado da referência (28)

### Combinação de vírus oncolíticos e terapia celular adotiva

Dado o potencial de os OV's modularem o sistema imunitário no TME, surgiu a possibilidade de combiná-los com imunoterapias para um efeito terapêutico sinérgico e eficaz. Ribas *et al.* (29) reportaram os sinais clínicos de um ensaio de fase Ib devido ao impacto do Talimogene laherparepvec (T-VEC) na eficácia terapêutica do anticorpo anti-PD1, pembrolizumab em pacientes com melanoma metastático. (29)

Esta combinação foi bem tolerada e o T-VEC promoveu a infiltração de células T no tumor e melhorou a ação terapêutica de pembrolizumab. Este estudo traz esperança de que os benefícios dos *checkpoints* inibitórios possam ser aproveitados em combinação com os OVVs, mesmo em tipos de tumores que anteriormente mostravam uma resposta muito baixa aos *checkpoints* inibitórios, como cancro de mama, próstata e cólon. (29)

Assim sendo, os vírus oncolíticos são o parceiro ideal das células CAR para ultrapassar várias barreiras intratumorais. (4) As células T CAR são capazes de reconhecer todos os antígenos na superfície tumoral independentemente do complexo principal de histocompatibilidade, minimizando assim a possibilidade de a célula cancerígena escapar à desregulação do MHC I. (29)

A lise direta de células tumorais pelos vírus reduz a capacidade tumoral e facilita a infiltração das células CAR. As células tumorais infetadas com o vírus emitem sinais de perigo que revertem a imunossupressão no tumor, o que assegura o tráfego, proliferação e persistência das células T CAR. No processo de lise de células induzida pelo vírus, são libertados antígenos intracelulares associados a tumores (neo-antígenos) e é formada uma resposta das células T a esses antígenos que em sinergia com as células T CAR e as células T específicas do vírus, ajudam a eliminar células tumorais sem expressão do alvo CAR. (4)

### **Adenovírus e células T CAR**

Os estudos clínicos que existem são baseados na combinação das células T CAR e de adenovírus, especialmente o serotipo 5. No entanto, os serotipos 3 e 35 têm sido atrativos devido à maior expressão dos seus recetores nas células tumorais de tumores avançados, em contraste com o principal recetor do Ad5 (recetor *coxsackie*-adenovírus, CAR). (30)

#### *Adenovírus*

Os adenovírus humanos são vírus sem envelope com formato icosaédrico que pertencem à família *Adenoviridae* que infeta uma grande variedade de células e tecidos em divisão e em não divisão. Têm um genoma de DNA linear, de cadeia dupla, com cerca de 26 a 45 kpb de tamanho, que codifica cerca de 30 a 40 genes. (31)

Foram isolados pela primeira vez a partir de culturas de tecido adenoide humano em 1953 e, desde então, foram identificados e caracterizados cerca de 57 serotipos e são ainda classificados com base na sequência do genoma e na diferenciação imunológica em 7 espécies

e infetam uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, no entanto a sua replicação no hospedeiro é específica da espécie. Os Ads humanos não se replicam de maneira eficiente noutros hospedeiros, têm uma alta atividade lítica e podem ser usados como agentes antitumorais infetando principalmente células epiteliais do trato respiratório, causando sintomas leves como congestão nasal, tosse, rinite e conjuntivite. (31)

#### *Adenovírus como agente oncolítico*

Como referido anteriormente, o Ad humano do serotipo 5 é mais comumente utilizado no campo da viro-imunoterapia oncolítica pelas diversas vantagens que apresenta. É capaz de infetar uma ampla gama de células em divisão e em não divisão, característica importante para o tratamento de células estaminais cancerígenas, que geralmente mantêm uma baixa taxa de proliferação. Os Ads podem ser direcionados seletivamente para matar células cancerígenas e são fármacos auto-amplificadores, ou seja, a replicação numa célula cancerígena leva à libertação de muitas partículas de descendência viral, pelo menos em teoria, a infecção por Ads pode persistir até que o tumor seja completamente erradicado. (31)

Podem ser vantajosos para o tratamento de tumores resistentes à terapia, porque possuem mecanismos complexos de morte e não dependem apenas da morte celular apoptótica e necrótica. Uma segunda grande vantagem dos Ads é que eles permanecem e replicam-se nas células hospedeiras num estado episomal não integrado, o que reduz o risco de oncogénese por mutagénese de inserção. O genoma do adenovírus é bem estudado e pode ser facilmente manipulado para inserir e codificar genes terapêuticos, por exemplo para o tratamento de doenças metabólicas e degenerativas. (31)

#### *Terapêutica combinada de células T CAR e adenovírus*

Do ponto de vista biológico, as barreiras estromais intratumorais, a falta de recetores de entrada de adenovírus nas células tumorais e a presença de anticorpos neutralizantes pré-existentes podem interferir na replicação e entrega do vírus no tumor, levando a limitações na utilização de adenovírus oncolíticos em monoterapia. (30) Também importa referir que a ineficácia terapêutica das células T CAR pode ser causada por vários fatores, incluindo o tráfego insuficiente de células T CAR e um microambiente imunossupressor. (32)

Para resolver estes problemas, *Watanabe* (30) utilizou o TILT-123 para melhorar a sobrevivência e reduzir a carga tumoral em murganhos imunodeficientes portadores de

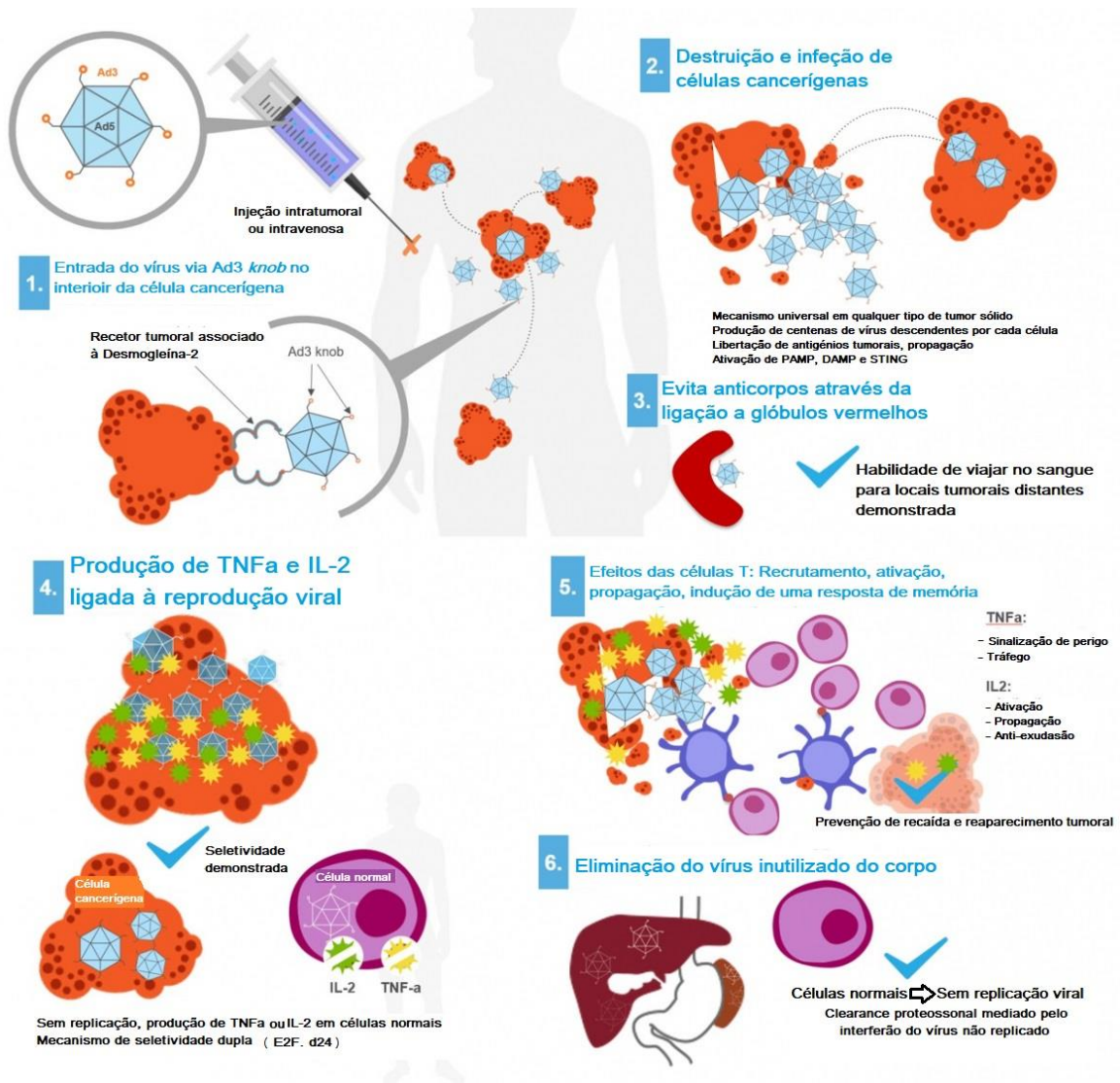
adenocarcinoma ductal pancreático humano e receberam células T CAR direcionadas à mesotelina. (30)

Os produtos da TILT são adenovírus oncolíticos modificados de várias maneiras, para permitir a sua utilização no melhoramento da terapia com células T. O TILT-123 está armado com as citocinas mais potentes no contexto de respostas antitumorais adaptativas, é geneticamente modificado para melhorar o acesso às células cancerígenas e aumentar a sua segurança. (32)

O TILT-123 é um adenovírus quimérico 5/3 humano antitumoral modificado para expressar o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-2 (IL-2), desenvolvido para se replicar apenas em células com defeitos na via de sinalização de retinoblastoma/p16 encontrada na maioria das células cancerígenas humanas. **(Figura 5)** (33)

A proteína ad3 é expressa na superfície do TILT-123 e após injeção, essa proteína reconhece o recetor desmogleína-2 na superfície da célula cancerígena e quando entra na célula, o vírus prolifera para produzir as duas citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-2) que por sua vez ativam as células T para aumentar a resposta imune e destruir as células cancerígenas. **(Figura 5)** (33)

Encontra-se neste momento a decorrer um ensaio clínico aberto, de fase I, *first-in-human*, com escalonamento de dose, multicêntrico, multinacional, para avaliar a segurança do adenovírus oncolítico TILT-123 como monoterapia e em associação com terapia de células T com linfócitos infiltrantes de tumores em pacientes com melanoma metastático (NCT04217473). (34)



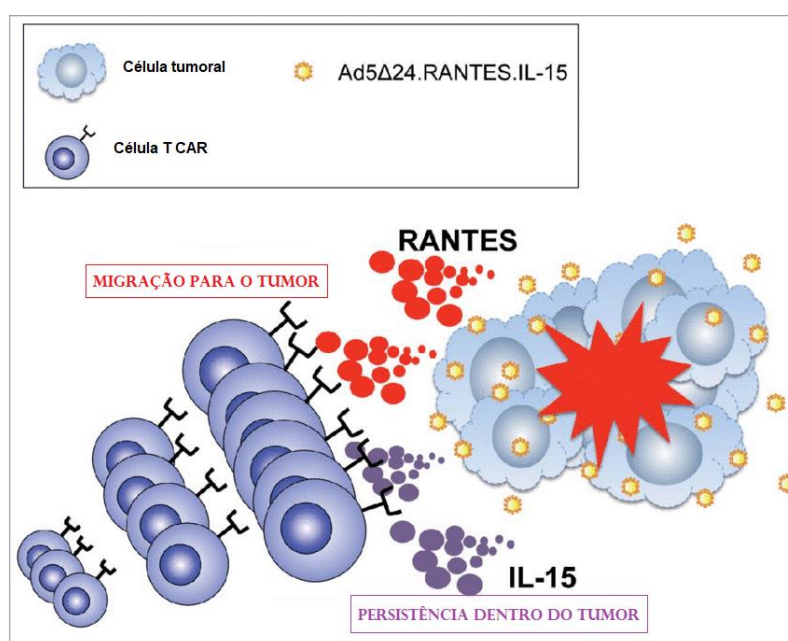
**Figura 5** – Descrição do mecanismo de ação do TILT-123 no corpo humano. O TILT-123 foi desenvolvido para se replicar seletivamente em células cancerígenas e produzir citocinas imunoestimuladoras TNFα e IL-2 no tumor. Tem como objetivo principal aumentar a entrada de células no tumor, e pode ser administrado quer localmente, quer por via sistêmica, o que o torna potencialmente aplicável ao tratamento de uma ampla variedade de tumores. Adaptado da referência (33)

Existem desafios adicionais impostos pelo microambiente tumoral no contexto da terapia celular T CAR que dizem respeito ao crescimento excessivo de clones resistentes de células tumorais sem o antígeno alvo e /ou a regulação negativa dos antígenos alvo no tumor. (30)

Foi então desenvolvido por *Nishio et al.* (24) um adenovírus oncolítico serotipo 5 armado (Ad5Δ24) com quimiocina ligante 5 (CCL5, mais conhecida como RANTES) e IL-15, duas moléculas imunomoduladoras selecionadas com base em dados clínicos e pré-clínicos. A citocina IL-15 foi selecionada pelos seus múltiplos efeitos benéficos nas células T e pela capacidade geral de aumentar as funções antitumorais das mesmas e a CCL5 foi selecionada

devido ao fato de ser uma quimiocina potente que mantém os seus receptores nas células T expandidas *ex vivo*. (24)

Demonstrou-se que células de neuroblastoma infectadas com Ad5Δ24.RANTES.IL-15 produzem níveis funcionais de RANTES e IL-15 *in vitro* e *in vivo*, enquanto o efeito citopático do vírus é conservado. Num modelo de rato xenogénico, a terapia combinada com Ad5Δ24.RANTES.IL-15 e células GD2.T CAR (*disialoganglioside GD2 chimeric antigen receptor T based*) aumentaram significativamente a sobrevivência de murganhos em comparação com qualquer uma das monoterapias. Além disso, tanto a RANTES quanto a IL-15 libertadas pelo OV armado foram detetadas predominantemente no local do tumor e não no soro, indicando uma expressão local preferencial de ambos os fatores. Esta estratégia contornou as toxicidades associadas à administração sistémica de citocinas. (Figura 6) (24)



**Figura 6** – Terapia combinada de células T CAR e Ad5Δ24 equipadas com RANTES e IL-15. Os vírus oncolíticos infectam seletivamente as células tumorais e espalham-se para a vizinhança após replicação. A quimiocina RANTES atrai células T modificadas pelo CAR circulantes para o local do tumor infectado pelo vírus e as células T CAR persistem pela presença da interleucina 15 e pela estimulação específica do antígeno. Adaptado da referência (24)

## VI. ALTERNATIVA À UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS T CAR: CÉLULAS CAR-NK

Atualmente, estão em desenvolvimento clínico várias células T CAR direcionadas a diferentes antígenos tumorais de superfície para tratar neoplasias hematológicas e vários tumores sólidos. (4)

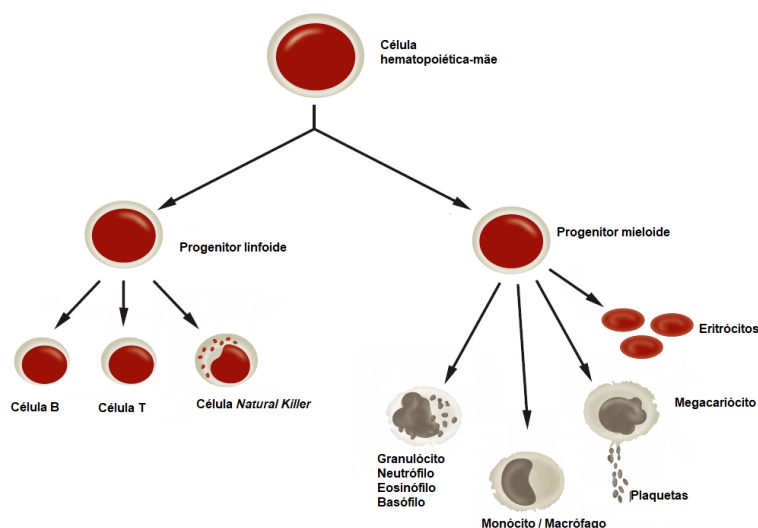
Apesar do sucesso precoce da terapia com células T CAR, especialmente em doenças hematológicas, as aplicações clínicas em larga escala da terapia com células T CAR podem ser limitadas pela preparação individualizada e por vários efeitos colaterais, como CRS, toxicidades neurológicas e efeitos não tumorais. Diante destes problemas, as células NK têm sido propostas como direcionadoras de CAR. (4)

### **Células NK**

As células NK são linfócitos pertencentes ao sistema imunitário inato que funcionam como primeira linha na defesa de infecções virais e células tumorais. Abrangem cerca de 15-29% dos linfócitos circulantes (3ª maior população a seguir aos linfócitos T e células B) e são caracterizadas pela expressão de um marcador de superfície CD56 e ausência do recetor de linfócitos T associado (CD56+ CD3-). São produzidas na medula óssea a partir de um ascendente hematopoiético e diferenciam-se nos tecidos linfáticos, baço, fígado, pulmões e sangue periférico. **(Figura 7)** (35)

Existem dois subtipos de células NK principais que se distinguem pela densidade do marcador CD56: NK *bright* e NK *dim*. A maioria das células NK humanas, aproximadamente 90%, apresentam baixa intensidade de expressão de CD56, uma fração constante de imunoglobulinas (CD16), são conhecidas por NK *dim* e são responsáveis pela citotoxicidade dependente de anticorpos (ADCC) através do recetor CD16 e medeiam a resposta imune inata imediata contra células tumorais ou infetadas. As restantes células, cerca de 10%, as NK *bright* exprimem intensamente o marcador CD56 e têm ausente a expressão de CD16 e de recetores *immunoglobulin-like*, apresentam elevada capacidade de proliferação e funções imunorregulatórias devido à produção de citocinas como o interferão gama (IFN- $\gamma$ ), fator estimulador de colónias de granulócitos (GM-CSF) e TNF- $\alpha$ , entre outros. (35)





**Figura 7** – Diferenciação de células estaminais hematopoiéticas em vários tipos de células sanguíneas e imunes. As células hematopoiéticas-mãe diferenciam-se em progenitores linfoides e mieloides que por sua vez dão origem a células linfoides e sanguíneas, respectivamente. Adaptado da referência (36)

### Células T CAR versus Células NK CAR

A utilização de células *natural killer* como transportadoras de CAR pode diminuir relativamente as desvantagens das células T CAR. As células NK não possuem expressão de recetores de células T e, portanto, não podem causar reação do enxerto contra o hospedeiro, o que torna viável e seguro o transplante alogênico de células NK e CAR-NK. Estas células devem ser sujeitas a radiação gama antes da administração ao paciente para evitar uma possível rejeição, uma vez que a irradiação destas células priva a sua proliferação mantendo a atividade citotóxica. (4) Por exemplo, vários estudos de fase I/II mostraram que as infusões alogênicas de células NK são bem toleradas e não levam a doença do enxerto contra o hospedeiro e toxicidade severa, portanto, as células NK são *CAR drivers* universais que não se limitam a células autólogas. (4) (37)

Um dos principais efeitos colaterais na terapia com células T CAR são os efeitos *on-target/off-tumor* devido à persistência das células T CAR. Pelo contrário, as células CAR-NK têm uma vida útil limitada na circulação, levando a poucos efeitos *on-target/off-tumor*. Além disso, o tipo de citocinas produzido pelas células NK difere daquele produzido pelas células T e por isso atraem outras células imunocompetentes, geralmente produzem IFN- $\gamma$  e GM-CSF, enquanto que a tempestade de citocinas (hipercitocinemia) induzida pelas células T CAR é principalmente mediada por citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6. (4) (37)

Adicionalmente, além de eliminar as células alvo por meio de um mecanismo específico de CAR (através do reconhecimento associado ao tumor via scFv), as células NK podem matar espontaneamente células tumorais reconhecendo diversos ligantes por meio de uma variedade de recetores ativadores, incluindo recetores de citotoxicidade (NKp46, NKp44 e NKp30), NKG2D e DNAM-1 (CD226). (37)

Estes recetores de ativação NKp geralmente reconhecem ligantes induzidos por stress expressos em células tumorais sob pressão de células imunes ou devido a tratamentos a longo prazo. Portanto, as células NK que expressam CAR podem matar células alvo por meio de mecanismos dependentes de recetores de células NK e dependentes do CAR para erradicar células tumorais positivas para o antígeno associado a tumores ou células tumorais que expressam ligantes para recetores de células NK. (37)

De facto, determinados ensaios clínicos mostraram que as células T CAR não podem erradicar células tumorais altamente heterogêneas, enquanto as células NK modificadas por CAR podem ser capazes de erradicar eficientemente células tumorais residuais que podem mudar os seus fenótipos após tratamento a longo prazo. (37)

Uma outra vantagem é o facto de as células NK serem abundantes em amostras clínicas e poderem ser geradas a partir de várias linhas celulares nomeadamente, sangue periférico (PB), sangue do cordão umbilical (UCB), células estaminais embrionárias humanas (hESCs), de células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs) e até células NK-92. As células NK-92 fornecem uma população celular homogênea e podem ser facilmente expandidas sob os padrões de boas práticas de fabrico para aplicações clínicas mais amplas, permitindo a produção "off-the-shelf" de células NK-92 modificadas por CAR, no entanto, devem ser irradiadas antes da infusão devido à sua origem na linha de células tumorais. As células PB-NK ativadas expressam uma gama mais ampla de recetores ativadores e podem ser administradas sem irradiação, o que lhes permite expandir *in vivo*. As células NK derivadas de iPSCs ou hESCs combinam as vantagens das células PB-NK e NK-92, uma vez que exibem um fenótipo semelhante ao das células PB-NK e são uma população homogênea. (37)

## VII. QUESTÕES ÉTICAS E ECONÓMICAS

A terapia com células T CAR na Europa é supervisionada pelo Comité de Terapias Avançadas da Agência Europeia do Medicamento. Enquadrando-se na categoria de medicamentos de terapia avançada, são classificadas mais especificamente como células

geneticamente modificadas e, portanto, são consideradas medicamentos de terapia genética e devem passar pelo procedimento central de autorização de introdução no mercado. (38)

Como as células T autólogas geneticamente modificadas são consideradas organismos geneticamente modificados (OGM), os ensaios clínicos para terapias com células T CAR também exigem aprovação para a utilização e liberação de um OGM, baseado numa avaliação de risco para o meio ambiente e para os profissionais de saúde que manipulam o produto. No entanto, os OGM são classificados e regulados de maneira diferente entre os estados membros da União Europeia (UE), levando a diferentes processos de aplicação com prazos variados e essa autorização específica vem além da aprovação dos comitês de ética e das autoridades nacionais competentes. (38)

### **Ética**

A imunoterapia celular, como uma promissora terapia tumoral, trouxe grande esperança de sobrevivência a muitos pacientes oncológicos. Um dos dilemas éticos enfrentados pelos investigadores é o requisito, nas pesquisas em fase inicial, de projetar estudos que sejam seguros, enquanto mostrem atividade biológica e beneficiem os pacientes, muitos dos quais com pouca ou nenhuma opção de tratamento terapêutico ou mesmo paliativo. (39)

No entanto, devido às diferentes indicações para diferentes opções de tratamento, a escolha do paciente certo é um fator importante na segurança e eficácia do tratamento. Com base nos requisitos éticos básicos, investigadores e instituições de pesquisa devem avaliar de forma razoável e abrangente os riscos e benefícios para os participantes e maximizar a proteção dos direitos dos mesmos. O principal risco para os pacientes em ensaios clínicos é o risco de dor e complicações causadas pelo tratamento. (39)

As células utilizadas em terapias imunológicas podem ser divididas em células autólogas ou alogênicas, de acordo com a sua origem, incluindo principalmente células derivadas de sangue periférico, de sangue do cordão umbilical, de células estaminais hematopoiéticas e células derivadas de linha celular e precisam ser tratadas *in vitro* e ter processos de reinfusão adotivos. Garantir a mais alta qualidade das células utilizadas na imunoterapia contra o cancro pode evitar a violação do princípio ético de não causar danos. (39)

## **Economia**

À medida que a medicina avança, os custos dos cuidados de saúde tendem a aumentar. Num sistema de saúde com recursos finitos, é necessário tomar decisões sobre como alocar fundos, distribuir justamente riscos e benefícios das inovações e avaliar e interpretar o valor de novas intervenções. (40)

O tratamento com o Kymriah<sup>®</sup> da Novartis custa € 320.000 na Alemanha e o Yescarta<sup>®</sup> da Gilead € 350.000 em França; no entanto, estes preços são apenas para os medicamentos e não representam os custos associados à leucaferese, terapia de linfodepleção e os efeitos adversos da imunoterapia com T CAR. Os especialistas estimam que, após considerar a hospitalização e outros medicamentos necessários para o procedimento, o total sobe para mais de € 1 milhão por paciente. (41) (42)

Ao considerarmos questões de valor e equidade, devemos avaliar o grau em que os pacientes devem estar envolvidos no processo de tomada de decisão em relação à utilização de terapias caras. Em algumas situações, alguns ou todos os custos das intervenções consideradas recaem sobre os pacientes, tornando o custo um fator importante na tomada de decisão do paciente. (40)

## **VIII. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS**

No geral, os recentes avanços feitos no campo da terapia baseada em CAR são impressionantes, uma vez que muitos pacientes com neoplasias hematológicas beneficiam de tratamentos com células T CAR. Embora exista menos sucesso em tumores sólidos, melhores técnicas de engenharia e terapias combinadas com vírus oncolíticos podem ser a chave para melhorar os resultados em neoplasias sólidas e o surgimento de outras terapias celulares associadas a CARs, incluindo as células CAR-NK, lançaram *insights* adicionais e trouxeram esperança de que os avanços na bioengenharia possam permitir a utilização mais ampla e eficaz destas células imunológicas no cancro. (20)

Apesar da promessa otimista de combinar estruturas de células CAR e virolíticas para o tratamento de tumores, muitos problemas permanecem sem solução. Alguns deles são a escolha do esquema e ordem de administração e dos métodos de entrega dos componentes celulares e virais. É lógica a introdução primeira do vírus de modo a modificar o microambiente imunossupressor do tumor e induzir o efeito citolítico direto que facilita a infiltração das células CAR. (4) A administração intratumoral leva a uma rápida acumulação do vírus

oncolítico no tumor, contudo não é aplicável a muitos deles, especialmente às metástases. A administração sistêmica é mais simples e potencialmente mais efetiva para alcançar todos os nódulos tumorais incluindo metástases distantes, mas vem acompanhado de mais riscos de complicações pós-injeção. Para além disso, títulos altos de anticorpos antivirais que aparecem após a primeira injeção e que neutralizam as partículas virais na corrente sanguínea são capazes de anular o efeito de injeções subsequentes. (4)

As células T CAR específicas para determinados vírus podem ganhar a habilidade de reconhecer células tumorais infectadas ou não com o vírus através dos seus recetores naive e quiméricos, respetivamente. Representam uma variante ideal de CAR para terapias combinadas, desde que a presença do vírus não remova apenas a imunossupressão dentro do tumor e assegure a infiltração das células T CAR e estimule a sua proliferação. Uma desvantagem desta terapia é a rápida *clearance* do vírus oncolítico do corpo. (4)

Até à data, os ensaios que utilizam a combinação de células CAR e terapia viral em tumores sólidos mostram um efeito sinérgico e removem as principais limitações da monoterapia. A possibilidade de combinar vários vírus oncolíticos com células CAR são ilimitadas e a ampla aplicação desta tecnologia traz esperança na melhoria da terapêutica de pacientes com tumores sólidos em estado avançado. (4)

As células NK, outra variante das células T, além de erradicarem uma grande variedade de células tumorais, também podem atingir células estaminais cancerígenas, uma pequena subpopulação de células inativas, autorrenováveis, quimio- e radio-resistentes residentes na massa tumoral. Vários estudos mostraram uma ligação entre a presença de um grande número de células NK infiltradas no TME e um prognóstico melhorado para tumores sólidos. (43)

No entanto, o tipo de tumor, a composição de quimiocina do microambiente do tumor e o baixo tráfego para os locais do tumor limitam os benefícios das células NK endógenas ou adotivas. As citocinas imunossupressoras libertadas por células tumorais ou estromais, incluindo fator de crescimento transformador beta, fator inibidor de migração de macrófagos e prostaglandinas E2, regulam negativamente a expressão de recetores de células NK ativadoras, além disso, a estimulação crónica induzida por ligantes e as condições de hipoxia podem inibir a atividade das células NK. Assim sendo, é necessário criar novas estratégias para combater a evasão tumoral e melhorar a eficácia da imunoterapia adotiva baseada em células NK em tumores sólidos. (43)

Para além dos ensaios clínicos das células T CAR em tumores líquidos e sólidos, estão também a ser estudadas em doenças autoimunes como o vírus da imunodeficiência humana

(HIV). Semelhante ao tratamento de tumores, através de TAA expressos na superfície das células tumorais, as células T CAR podem ser modificadas, visando auto-antígenos ou anticorpos específicos expressos na superfície celular patogénica. Com os avanços na atualização das construções CAR e na acumulação de estudos pré-clínicos, é possível que a imunoterapia derivada de células T CAR venha a ser aplicada em síndromes da imunodeficiência adquirida (SIDA), mas ainda há um longo caminho a percorrer até que possamos aplicá-las nesta área. (44)

Em suma, desenvolver uma estratégia de avaliação razoável neste campo altamente inovador, porém complexo, da imunoterapia contra o cancro, que respeite as ordens éticas de produzir conhecimento, fornecer pesquisa clínica viável e, ao mesmo tempo, assegurar ao paciente o tratamento esperado é a maior oportunidade e desafio da comunidade oncológica. (45)

## **IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. FILLEY, A. C., HENRIQUEZ, M. e DEY, M. - **CART Immunotherapy: Development, success, and Translation to Malignant Gliomas and Other Solid Tumors.** Vol. 8 (2018).
2. CUF. **Imunoterapia: como funciona o mais inovador dos tratamentos.** [Acedido:15 de maio 2020]. Disponível em: <https://www.cuf.pt/mais-saude/imunoterapia-como-funciona-o-mais-inovador-dos-tratamentos>
3. RAMAKRISHNA, S., BARSAN, V. e MACKALL, C. - **Prospects and Challenges for Use of CAR T Cell Therapies in Solid Tumors.** (2020), 503-516.
4. KOCHNEVA, G. V. - **Combination of Oncolytic Virotherapy and CAR T/NK Cell Therapy for the Treatment of Cancer.** Vol. 54. (2019), 13-16.
5. HARRER, D., DORRIE, J. e SCHAFT, N. - **Chimeric antigen receptors in different cell types: new vehicles join the race.** *Human Gene Therapy*, (2019).
6. JUNE, C. H. - **CAR Tcell immunotherapy for human cancer.** *CANCER IMMUNOTHERAPY.* (2018), p. 1361-1365.
7. MATEUS, D. M., BORGES, O. e CRUZ, M. T. - **Células T com Recetor de Antígeno Quimérico (CAR): Uma Nova Estratégia Imunoterapêutica.** Vol. 11(2019), 103-112.
8. PFEFFERLE, A. e HUNTINGTON, N. D. - **You Have Got a Fast CAR: Chimeric Antigen Receptor NK Cells in Cancer Therapy.** *MDPI Journal.* Vol. 2 (2020).
9. LEUKEMIA & LYMPHOMA SOCIETY. - **CAR T-Cell Therapy- A new era in cancer treatment.** (2017), 5-18.
10. ROEX, G.; FEYS, T.; BEGUIN, Y.; KERRE, T.; POIRÉ, X.; LEWALLE, P.; VANDENBERGHE, P.; BRON, D.; ANGUILLÉ, S. - **Chimeric Antigen Receptor-T-Cell Therapy for B-Cell Hematological Malignancies:An Update of the Pivotal Clinical Trial Date.** Vol. 194 (12), (2020), 1-15.
11. PARLAMENTO EUROPEU, CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA. **REGULAMENTO (CE) N.º 1394/2007 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 13 de Novembro de 2007** elativo a medicamentos de terapia avançada e que altera a Directiva 2001/83/CE e o Regulamento (CE) n.º 726/2004. *Jornal Oficial da União Europeia.* (2007).

12. ZHANG, C.; LIU, J.; ZHONG, J. F.; ZHANG, X. - **Engineering CAR-T cells.** (2017), 1-6.
13. ELAHI, R.; KHOSH, E.; TAHMASEBI, S.; ESMAEILZADEH, A.,- **Immune Cell Hacking: Challenges and Clinical Approaches to Create Smarter Generations of Chimeric Antigen Receptor T Cells.** *Frontiers in Immunology.* Vol. 9 (2018).
14. CHEADLE, E. J.; GORNALL, H.; BALDAN, V.; HANSON, V.; HAWKINS, R. E.; GILHAM, D. E., - **CAR T cells: driving the road from the laboratory to the clinic.** *Immunological Review.* Vol. 257. (2014), 91-106.
15. ABREU, T.; FONSECA, N. A.; GONÇALVES, N.; MOREIRA, J. N. - **Current challenges and emerging opportunities of CAR-T cell therapies.** *Journal of Controlled Release.* (2019).
16. LEVINE, BL. - **Performance-enhancing drugs: design and production of redirected chimeric antigen receptor (CAR) T cells.** *Cancer Gene Therapy.* Vol. 22, (2015), 79-84.
17. ANDROULLA, M. N. e LEFKOTHEA, P. C. - **CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy.** *Current Pharmaceutical Biotechnology.* Vol. 19, (1), (2018), 5-18.
18. KALAITSIDOU, M.; KUEBERUWA, G.; SCHÜT, A.; GHILHAM, D. E. - **CAR T-cell therapy: toxicity and the relevance of preclinical model.** *Adoptive cell immunotherapy for cancer.* Vol. 7, (5), (2015), 487-497.
19. ZHANG, B.; QIN, D.; MO, Z.; LI, Y.; WEI, W.; WANG, Y.; WANG, W.; WEI, Y. - **Hurdles of CAR-T cell-based cancer immunotherapy directed against solid tumors.** Vol. 59,(4), (2016), 340-348.
20. PETTY, P. J., HEYMAN, B. e YANG, Y. - **Chimeric Antigen Receptor Cell Therapy: Overcoming Obstacles to Battle Cancer,** *MDPI Cancers 2020,* Vol. 12, (2020), 1-18.
21. SCHMIDTS, A. e MAUS, M. V. - **Making CAR T Cells a Solid Option for Solid Tumors.** *Frontiers in Immunology.* Vol. 9, (2018).
22. ACHARD, C.; SURENDRAN, A.; WEDGE, M.; UNGERRECHTS, G.; BELL, J.; ILKOW, C. S. - **Lighting a Fire in the Tumor Microenvironment Using Oncolytic Immunotherapy.** *EBioMedicine, ELSEVIER,* Vol. 31 (2018), 17-24.
23. ROCHE. - **O microambiente tumoral tem um papel no ciclo da imunidade contra o cancro.** [Acedido:18 de junho 2020]. Disponível em: <https://www.rochenet.pt>



/sites-e-learning/investigacao-imunoterapia-contracancro/visao-geral/microambiente-tumoral.html

24. NISHIO, N. e DOTTI, G. - **Oncolytic virus expressing RANTES and IL-15 enhances function of CAR-modified T cells in solid tumors.** *OncolImmunology*, Taylor & Francis Group, LLC, (2015).
25. BOMMAREDDY, P. K., SHETTIGAR, M. e KAUFMAN, H. L. - **Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy.** Vol. 18 (2018), 498-513.
26. CERVERA-CARRASCON, V., HAVUNEN, R. e HEMMINKI, A. - **Oncolytic adenoviruses: a game changer approach in the battle between cancer and the immune system.** *Expert Opinion on Biological Therapy*, Taylor & Francis Group, (2019), 1-14.
27. TWUMASI-BOATENG, K.; PETTIGREW, J. L.; KWOK, Y. Y. E.; BELL, J. C.; NELSON, B. H. - **Oncolytic viruses as engineering platforms for combination immunotherapy.** *Nature reviews | CANCER*. 2018.
28. DAVOLA, M. E. e MOSSMAN, K. L. - **Oncolytic viruses: how “lytic” must they be for therapeutic efficacy?** *ONCOIMMUNOLOGY*. Vol. 8, (6), (2019).
29. CHAURASIYA, S., CHEN, N. G. e FONG, Y. - **Oncolytic viruses and immunity.** *Current Opinion in Immunology*. Vol. 51 (2018), 83-90.
30. SANTOS, J. M., HAVUNEN, R. e HEMMIKI, A. - **Modulation of the tumor microenvironment with an oncolytic adenovirus for effective T-cell therapy and checkpoint inhibition.** Vol. 635, (2020), 205-230.
31. RAMACHANDRAN, M. - **Cancer Immunotherapy Evolving Oncolytic viruses and CAR T-cells.** *ACTA UNIVERSITATIS UPSALIENSIS UPPSALA*, (2016).
32. HEMMINKI, A. - **TILT Biotherapeutics.** *HUMAN VACCINES & IMMUNOTHERAPEUTICS* Vol. 13, (5), (2017), 970-971.
33. **ONCOLYTIC IMMUNOTHERAPY FOR ENABLING T-CELL THERAPIES AND CHECKPOINT INHIBITORS.** *tilt biotherapeutics*. [Acedido: 11 de junho 2020]. Disponível em: <https://tiltbio.com/>
34. **TNFalpha and Interleukin 2 Coding Oncolytic Adenovirus TILT-123 During TIL Treatment of Advanced Melanoma (TUNINTIL).** *Clinicaltrials.gov*. [Acedido: 11 de junho 2020]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04217473>

35. CORRAL SÁNCHEZ, M. D., CASANOVA, L. F. e PÉREZ-MARTÍNEZ, A. - **Beyond CAR-T cells: Natural killer cells immunotherapy.** *Medicina Clinica.* (2019), 1-9.
36. **In Vitro Expansion of CD34+/CD38- Human Hematopoietic Progenitor Cells in a Serum-free and Xeno-free Stem Cell Culture Media.** MERCK. [Acedido: 6 de junho 2020]. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/cell-culture/hematopoietic-stem-cell-media.html>
37. HU, Y., TIAN, Z. e ZHANG, C. - **Chimeric antigen receptor (CAR)-transduced natural killer cells in tumor immunotherapy.** *Acta Pharmacologica Sinica.* (2017), 1-10.
38. BUECHNER, J.; KERSTEN, M. J.; FUCHS, M.; SALMON, F.; JÄGER, U. - **Chimeric Antigen Receptor-T Cell Therapy: Practical Considerations for Implementation in Europe.** (2018).
39. REN, S.; DENG, J.; HONG, M.; REN, Y.; FU, H.; LIU, Y.; CHEN, Z. - **Ethical considerations of cellular immunotherapy for cancer.** *Zhejiang University and Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019, Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology),* Vol. 20, (2019), 23-31.
40. SILBERT, S., YANIK, G. A. e SHUMAN, A. G. - **How Should We Determine the Value of CAR T-Cell Therapy?** *AMA Journal of Ethics®,* Vol. 21, (10), (2019),844-851.
41. HERNANDEZ, I., PRASAD, V. e GELLAD, W. F. - **Total Costs of Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy.** *American Medical Association, JAMA Oncology,* Vol. 4, (2018).
42. FERNÁNDEZ, Clara Rodríguez. - **A Cure for Cancer? How CAR T-Cell Therapy is Revolutionizing Oncology.** *LABIOTECH.eu.* [Acedido: 20 de abril 2020.] Disponível em: <https://www.labiotech.eu/car-t/car-t-therapy-cancer-review/>
43. BHAT, R. e ROMMELAERE, J. - **Emerging role of Natural killer cells in oncolytic virotherapy.** *Dove Press journal: ImmunoTargets and Therapy,* Vol. 4, (2015), 65-77.
44. CHEN, Y.; SUN, J.; LIU, H.; YIN, G.; XIE, Q. - **Immunotherapy Deriving from CAR-T Cell Treatment in Autoimmune Diseases.** *Hindawi, Journal of Immunology Research* 9, Vol. 2019, (2019), 1-9.
45. REZAEI, N. - **Bench to Bedside Immunotherapy of Cancers.** [ed.] Nima Rezaei. s.l. : *Springer-Verlag Berlin Heidelberg,* (2015), ISBN: 978-3-662-44945-5 .

## ANEXO

### Anexo I: Circular n.º0261-2020 referente às alterações das Normas de Dispensa de medicamentos por via eletrónica



Associação Nacional das Farmácias

**MUITO IMPORTANTE**

Circular n.º 0261-2020

Lisboa, 30 de Julho de 2020

Assunto: Portaria n.º 284-A/2016 - alterações às Normas de Dispensa de medicamentos por via eletrónica

Exmo. Associado,

Em Novembro de 2016 foi publicada a Portaria n.º 284-A/2016, que veio alterar a Portaria n.º 224/2015, no que se refere às regras de prescrição e dispensa eletrónica de medicamentos e produtos de saúde.

As alterações identificadas na referida Portaria encontram-se previstas nas Normas de Dispensa do Infarmed desde Abril de 2018. No entanto, apenas no início do corrente ano foram dadas indicações pelos SPMS (Serviços Partilhados do Ministério da Saúde) aos diversos fornecedores de *software*, relativas à actualização dos sistemas de dispensa das farmácias.

Assim, concluídos os desenvolvimentos necessários à sua implementação, a partir do dia 3 de Agosto, verificam-se as seguintes transformações ao nível da dispensa eletrónica de medicamentos:

**1. Introdução de limite no número de embalagens de medicamentos dispensadas por mês, por utente e por receita**

A um utente, apenas podem ser dispensadas por mês e por receita:

- No máximo duas embalagens do mesmo medicamento; ou
- No máximo quatro embalagens do mesmo medicamento (no caso de embalagem unitária).

Sempre que o utente ultrapasse a quantidade máxima mensal passível de dispensa, em determinada receita, é retornado um erro de validação por parte dos SPMS: C022 - "O número de embalagens dispensadas é superior ao legalmente estabelecido e não foi indicada a respectiva justificação".

No entanto, o utente pode adquirir quantidades mensais superiores, mediante justificação a indicar no momento do atendimento.

São aceites as seguintes justificações (disponibilizadas nos sistemas de dispensa):

- Quantidade de embalagens para cumprir a posologia é superior a duas embalagens por mês; ou quatro embalagens por mês (no caso de embalagem unitária);
- Extravio, perda ou roubo de medicamentos;
- Dificuldade de deslocação à farmácia;
- Ausência prolongada do país.

As RSP cujo erro de validação não seja devidamente justificado serão alocadas ao lote 96x, sujeitas a conferência posterior, e passíveis de rectificação às farmácias pelo CCM-SNS.



Farmácias  
Portuguesas

Rua Marechal Saldanha, 1 - 1249-069 Lisboa  
Tel: 21 340 06 00 - Fax: 21 347 29 94  
email: [anf@anf.pt](mailto:anf@anf.pt) | [www.anf.pt](http://www.anf.pt)

2. Limitação do número de embalagens dispensadas em situação de dispensa offline

Devido aos limites mensais no número de embalagens dispensadas mencionados no ponto 1, e de forma a cumprir a orientação definida nas Normas de Dispensa, passa a ser possível a dispensa de apenas uma embalagem por cada medicamento/produto prescrito.

Esta alteração permite reduzir as situações de dispensas *offline* duplicada e/ou a ultrapassagem do número limite de embalagens por mês.

Para melhor compreensão dos procedimentos associados às novas Normas de Dispensa aconselhamos a consulta das OPL Sifarma anexas à circular.

Mais informamos que devido à complexidade das alterações constantes na Portaria n.º 284-A/2016, encontra-se prevista uma segunda fase de implementação das regras estabelecidas e associadas às justificações, passíveis de apresentação pelas farmácias no momento da dispensa.

Esta segunda fase, que ainda não tem uma data definida para disponibilização por parte dos SPMS, inclui a possibilidade de dispensa de embalagem de medicamento com dimensão diferente da prescrita e dispensa de linhas RSP fora do prazo de validade (por medicamento esgotado).

Manteremos as farmácias informadas dos desenvolvimentos registados.

Os serviços da ANF mantêm-se disponíveis para o esclarecimento de qualquer questão adicional.

Com os melhores cumprimentos,

A DIRECÇÃO



Anexos:

- OPL Módulo de Atendimento
- OPL Sifarma 2000