

Ângela Patrão Maximino

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Estratégias de Nanoimunoterapia em Oncologia” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, da Dra. Raquel Silva, da Dra. Carla Gonçalves e do Professor Doutor João Nuno Sereno Almeida Moreira e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Capa

**Inside Cover Image** “Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology” 9, 1 (2017), autoria de FONTANA *et al.* - “*Delivery of therapeutics with nanoparticles: what's new in cancer immunotherapy?*”.

Ângela Patrão Maximino

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Estratégias de Nanoimunoterapia em Oncologia” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, da Dra. Raquel Silva, da Dra. Carla Gonçalves e do Professor Doutor João Nuno Sereno Almeida Moreira e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Ângela Patrão Maximino, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2013172205, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Estratégias de Nanoimunoterapia em Oncologia” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 4 de setembro de 2018.

Ângela Patrão Maximino

(Ângela Patrão Maximino)

## AGRADECIMENTOS

Aos meus **pais** António Maximino e Lucinda Maximino pela paciência, pelo esforço e dedicação, pelos valores transmitidos, pelo amor incondicional, combustível que alimenta todos os meus sonhos, pela alegria de viver, pela simplicidade e pelo colo seguro em qualquer hora.

À minha **irmã** Suse Maximino por ser a fiel companheira de todas as horas, capaz de me ensinar que é nas coisas mais simples que está o segredo da vida, além de ser um exemplo de sucesso, ambição, coragem e sacrifício.

Aos meus **avós** e **padrinho** que partiram muito cedo para o reino de Deus, mas que assinalaram a minha infância e hoje dão algum sentido à minha vida.

A todos os **familiares** e **primos** pela alegria duradoura, pelo companheirismo, pela ambição e pela preocupação.

Ao meu **fiel amigo** e companheiro Nuno Teixeira por ser aquele que me ajuda a resolver muitos dos pequenos problemas do dia a dia com um sorriso e pelas palavras valiosas que me guiam.

Às **minhas meninas** Ana Rita Pinheiro, Francisca Santos, Inês Borges e Nácia Ramos colegas de curso e amigas para a vida, pelas conversas sem fim, pelas longas horas de estudo, pelas gargalhadas estridentes, pelas lágrimas de alegria, pela forma única de viver Coimbra e pelo apoio incomparável em todas as ocasiões.

À minha **família académica**, madrinha Joana Nunes e afilhada Rosa Fernandes, pela integração, pela alegria, pela união, pela humildade, pela amizade e pelo carinho.

Aos **restantes colegas** de curso pelo companheirismo, pelo reconhecimento e pelo contributo positivo na minha caminhada.

À **Dra. Raquel Silva** e a toda a equipa do Gabinete de Apoio da Comissão de Ética para a Investigação Clínica pela integração na equipa, pela compreensão, pela paciência, pela partilha de ensinamentos e experiências, pela dedicação e pela amizade construída, o meu agradecimento.

À **Dra. Carla Gonçalves** e a toda a equipa da Farmácia Holon Campo Grande pelo apoio incomparável, pela preocupação, pela entreatajuda, pelo espírito de equipa, pela lealdade, pelo respeito perante as minhas falhas e pela prontidão nos esclarecimentos, o meu agradecimento.

Ao **Professor Doutor João Nuno Sereno Almeida Moreira** por ser orientador da minha monografia, pela dedicação, pelo empenho, pelo acompanhamento, pela motivação, pelo exemplo de sucesso na área do Desenvolvimento e Tecnologias do Medicamento e pelas sinceras palavras de reconhecimento do meu trabalho.

À **Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra**, a melhor faculdade do país, pelos valores, pelo ensino rigoroso e pelas oportunidades oferecidas ao longo de cinco anos.

Por fim, a **Coimbra** por ser a cidade onde passei os melhores cinco anos da minha vida.

*“Coimbra é uma lição  
De sonho e tradição  
O lente é uma canção  
E a lua a faculdade  
O livro é uma mulher  
Só passa quem souber  
E aprende-se a dizer saudade...”*

Coimbra,  
Letra: José Maria Galhardo  
Música: Raúl Ferrão

## RESUMO

O presente documento único contempla dois relatórios de formação prática: o relatório de estágio referente ao Gabinete de Apoio da Comissão de Ética para a Investigação Clínica (Parte I) e o relatório de estágio em Farmácia Comunitária (Parte II). Estes apresentam os Pontos Fortes (*Strenghts*), Pontos Fracos (*Weaknesses*), Oportunidades (*Opportunities*) e Ameaças (*Threats*) que identifiquei no decorrer dos estágios. Este documento inclui ainda uma pesquisa bibliográfica (Parte III) que proporcionou a redação da monografia “Estratégias de Nanoimunoterapia em Oncologia”.

A intervenção farmacêutica nos cuidados de saúde primários é essencial. O farmacêutico desempenha um papel multifacetado na sociedade podendo contribuir positivamente para uma melhor qualidade de vida dos doentes.

Hoje é comum ouvir-se a seguinte premissa: “No futuro todos vamos morrer com uma doença que se chama cancro”. A realidade é devastadora para a maioria dos doentes com cancro, pois as terapêuticas convencionais não são suficientes.

Atualmente, um dos maiores desafios consiste no tratamento destes doentes através da estimulação do Sistema Imunitário - Imunoterapia - com recurso a nanosistemas - a Nanoimunoterapia. Neste novo conceito de tratamento, as células T e as células dendríticas (DCs) são alvos imprescindíveis.

Do ponto de vista tecnológico, uma vasta gama de nanopartículas (lipossomas, nanoesferas, nanocápsulas, micelas poliméricas, dendrímeros, nanopartículas de ouro (AuNPs), nanotubos de carbono (CNTs), nanopartículas mesoporosas de sílica (MSNPs) e nanopartículas magnéticas (MNPs) apresenta elevado potencial.

Contudo, a compreensão do ciclo da imunidade contra o cancro persiste ainda incompleta. Todavia, nos últimos dez anos, várias estratégias têm revelado resultados clínicos promissores.

A presente monografia destaca a administração de nanovacinas, *adoptive T cell therapy* (ATC), modulação do microambiente tumoral (TME) e *immune checkpoint therapy* como potenciais estratégias de nanoimunoterapia que superam muitas das limitações das terapêuticas convencionais.

**Palavras-chave:** Ensaios clínicos, Holon, Sistema Imunitário, Cancro, Nanopartículas.

## **ABSTRACT**

This single document includes two practical training reports, internship report at National Ethics Committee for Clinical Research (Part I) and internship report of Community Pharmacy (Part II). These reports include Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats that I have identified during the internships. This document also includes a bibliographical research (Part III) - the monograph entitled “Strategies of Nanoimmunotherapy in Oncology”.

Pharmaceutical intervention in primary health care is essential. The pharmacist play a vital role in in society and can contribute positively to a better quality of life for patients.

Today it is common to hear this premise: “In the future we will all die with a disease called cancer”. The reality is bad for most cancer patients because conventional therapies are not enough.

Today, one of the greatest challenges is cancer treatments designed to stimulate a patient's Immune System - Immunotherapy - with nanosystems - Nanoimmunotherapy. Targeting nanoparticles to T cells and dendritic cells (DCs) is important for Nanoimmunotherapy.

Different types of nanoparticles (liposomes, nanocapsules, polymeric micelles, dendrimers, gold nanoparticles (AuNPs), carbon nanotubes (CNTs), mesoporous silica nanoparticles (MSNPs) and magnetic nanoparticles (MNPs) are particularly valuable.

Notwithstanding, the understanding of cancer-associated immunology persists incomplete. The last ten years, several strategies have shown promising clinical outcomes.

The monograph highlighths nanovaccines, adoptive T cell therapy (ATC), modulation of the tumor microenvironment (TME) and imune checkpoint therapy as potential nanoimmunotherapy strategies that have overcome many of the limitations of conventional therapies.

**Keywords:** Clinical Trials, Holon, Immunity System, Cancer, Nanoparticles.



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Ativação de células T por DCs através de três sinais. Representação dos recetores co-inibitórios PD-1 e CTLA-4. (WANG, C. <i>et al.</i> , 2017).....	52
<b>Figura 2-</b> Ciclo da imunidade contra o cancro e respetivas estratégias de nanoimunoterapia. Representação dos três fenótipos imunológicos. (Adaptado de CHEN, 2013; CHEN e MELLMAN, 2017; GRACIOTTI <i>et al.</i> , 2017; JO <i>et al.</i> , 2017; KAPADIA <i>et al.</i> , 2015; QIU <i>et al.</i> , 2017).....	55
<b>Figura 3-</b> Componentes principais de uma nanovacina: antígenos tumorais, formulação, adjuvantes e veículos de entrega. (HU, Z. <i>et al.</i> , 2018).....	62
<b>Figura 4-</b> Direcionamento passivo (A) e ativo (B) de nanovacinas para as DCs. (TRAN <i>et al.</i> , 2018).....	63
<b>Figura 5-</b> Nanovacinas e aAPCs ativam células T e promovem a eliminação de células tumorais. (Adaptado de ZANG <i>et al.</i> , 2017).....	68
<b>Figura 6-</b> (A) <i>Design</i> de Nano-aAPC; (B) Nano-aAPC elipsoidal; (C) e (E) MNPs; (D) Influência do tamanho e da concentração de Nano-aAPCs na ativação de células T. (Adaptado de HICKEY <i>et al.</i> , 2017; RHODES e GREEN, 2018).....	69
<b>Figura 7-</b> <i>Immune checkpoint therapy</i> com anticorpos e estado de ativação das células TCD8 <sup>+</sup> . (DAVIES, 2014).....	72
<b>Figura 8-</b> Representação esquemática do “ <i>Immunoswitch</i> ”. (Adaptado de KOSMIDES <i>et al.</i> , 2017).....	73

# ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	i
RESUMO .....	iii
ABSTRACT .....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v

## **PARTE I - Relatório de Estágio no Gabinete de Apoio da Comissão de Ética para a Investigação Clínica**

LISTA DE ABREVIATURAS .....	2
INTRODUÇÃO .....	3
<b>ANÁLISE SWOT</b> .....	<b>5</b>
<b>Pontos Fortes</b> .....	<b>5</b>
• Receção e Acolhimento .....	5
• Equipa Focada e Motivada.....	5
• Acompanhamento.....	6
• Contacto com os Requerentes .....	6
• Tarefas no Contexto Profissional.....	7
<b>Pontos Fracos</b> .....	<b>8</b>
• Equipa Pequena Aliada à Irregularidade na Intensidade de Trabalho.....	8
• Seguro e Indemnização.....	8
<b>Oportunidades</b> .....	<b>9</b>
• Formação e Atualização de Conhecimentos.....	9
• Constituição de uma Equipa.....	9
• Participação nas Comemorações dos 25 anos do Infarmed .....	9
• Registo Nacional de Estudos Clínicos .....	10
<b>Ameaças</b> .....	<b>10</b>
• Pressão Externa.....	10
• Componente Teórica do MICF.....	11
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	12
ANEXOS.....	14

## PARTE II - Relatório de Estágio na Farmácia Holon Campo Grande

LISTA DE ABREVIATURAS .....	25
INTRODUÇÃO .....	26
<b>ANÁLISE SWOT</b> .....	<b>27</b>
<b>Pontos Fortes</b> .....	<b>27</b>
• Localização .....	27
• Equipa Holon .....	27
• Dispensa de Medicamentos com <i>Robot</i> .....	28
• Atendimento Diferenciado .....	29
• Programa de Estágio .....	30
<b>Pontos Fracos</b> .....	<b>30</b>
• Medicamentos Manipulados .....	30
• Cartão Saúde .....	31
<b>Oportunidades</b> .....	<b>31</b>
• Formações .....	31
• Serviços Farmacêuticos Prestados .....	32
• Intervenção na Comunidade .....	33
• MICF e Realidade Profissional .....	34
<b>Ameaças</b> .....	<b>34</b>
• Sistema Informático <i>WinPhar</i> .....	34
• Prescrição de Medicamentos por DCI .....	34
• Prescrição Manual .....	35
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36
ANEXOS .....	39

## PARTE III - Monografia Intitulada “Estratégias de Nanoimunoterapia em Oncologia”

LISTA DE ABREVIATURAS .....	47
<b>I- Sistema Imunitário</b> .....	<b>50</b>
I.1- Introdução .....	50
I.2- Imunidade Inata e Adaptativa .....	50
I.3- Células T .....	51

1.4- Células Apresentadoras de Antígenos (APCs) .....	52
<b>2- Sistema Imunitário e o Cancro .....</b>	<b>53</b>
2.1- Ciclo da Imunidade Contra o Cancro .....	54
2.2- Mecanismos que Inibem o Sistema Imunitário .....	56
2.2.1- Macrófagos Imunossupressores Associados ao Tumor (TAMs).....	58
2.2.2- Células Supressoras de Origem Mielóide (MDSCs).....	58
2.2.3- Células T Reguladoras (Tregs).....	59
<b>3- Nanoimunoterapia .....</b>	<b>60</b>
3.1- Introdução .....	60
3.2- Nanotecnologia .....	60
3.3- Estratégias de Nanoimunoterapia .....	61
<b>3.3.1- Nanovacinas: entrega de antígenos, adjuvantes e/ou ligandos para APCs.....</b>	<b>62</b>
3.3.1.1- Lipossomas.....	64
3.3.1.2- Nanopartículas de Ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) .....	66
3.3.1.3- Nanopartículas de Ouro (AuNPs).....	67
<b>3.3.2- Adoptive T cell Therapy (ATC): nano-aAPCs para ativação e expansão de células T.....</b>	<b>67</b>
3.3.2.1- Nanopartículas de Ácido poli(láctico-co-glicólico) PLGA .....	68
3.3.2.2- Nanopartículas Magnéticas (MNPs).....	70
3.3.2.3- Nanotubos de Carbono (CNTs).....	70
<b>3.3.3- Modulação do Microambiente Tumoral (TME): modulação de células imunossupressoras.....</b>	<b>71</b>
3.3.3.1- Modulação de TAMs .....	71
<b>3.3.4- Imune Checkpoint Therapy .....</b>	<b>72</b>
CONCLUSÃO .....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75
ANEXOS.....	82

# **PARTE I**

## **Relatório de Estágio no Gabinete de Apoio da Comissão de Ética para a Investigação Clínica**

Orientadora:

Dra. Raquel Sofia Faustino Silva

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ANS</b>	Alterações Não Substanciais
<b>BPC</b>	Boas Práticas Clínicas
<b>CD-ROM</b>	<i>Compact Disc Read-Only Memory</i>
<b>CE</b>	Comissão Executiva
<b>CEC</b>	Comissão de Ética Competente
<b>CEIC</b>	Comissão de Ética para a Investigação Clínica
<b>CES</b>	Comissão de Ética para a Saúde
<b>CNPD</b>	Comissão Nacional de Proteção de Dados
<b>DRHFP</b>	Direção de Recursos Humanos, Financeiros e Patrimoniais
<b>EMA</b>	Agência Europeia do Medicamento
<b>FFUC</b>	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
<b>GECC</b>	Gestão de Ensaio Clínicos da Comissão de Ética para a Investigação Clínica
<b>INFARMED</b>	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.
<b>MICF</b>	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
<b>OF</b>	Ordem dos Farmacêuticos
<b>PON</b>	Procedimento Operativo Normalizado
<b>PPAS</b>	Pedido de Parecer para a Realização de uma Alteração Substancial
<b>PPREC</b>	Pedido de Parecer para a Realização de um Ensaio Clínic
<b>RNCES</b>	Rede Nacional de Comissões de Ética
<b>RNEC</b>	Registo Nacional de Ensaio Clínicos
<b>SGQ</b>	Sistema de Gestão de Qualidade
<b>SUSAR</b>	<i>Suspected Unexpected Serious Adverse Reaction</i>
<b>SWOT</b>	<i>Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats</i>

## INTRODUÇÃO

No Estatuto da Ordem dos Farmacêuticos (OF) (2015), o “ato farmacêutico é da exclusiva competência e responsabilidade dos farmacêuticos”. O medicamento constitui o pilar deste ato, contudo nele constam uma multiplicidade de atividades, além da Farmácia Comunitária, onde o farmacêutico pode intervir (Lei nº 131/2015 de 4 de setembro).

A par das dificuldades de empregabilidade e desvalorização da remuneração, a aquisição de novas competências poderá ajudar a ultrapassar situações desfavoráveis. Neste contexto, os alunos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) podem realizar um estágio curricular de três meses, opcional, além do que é exigido na Europa para obter o título de Farmacêutico “seis meses de estágio em farmácia aberta ao público ou num hospital” (Diretiva nº 2013/55/EU de 20 de novembro). O meu interesse pela investigação clínica, na área dos ensaios clínicos, levou-me a escolher o estágio opcional na Comissão de Ética para a Investigação Clínica (CEIC).

A ética na investigação clínica começa a ser debatida após os ensaios trágicos realizados em prisioneiros durante a II Guerra Mundial, reconhecendo-se a necessidade de implementar princípios éticos orientadores (VELOSO, 2009). Surge em 1947 o Código de Nuremberga com dez princípios básicos posteriormente incorporados na Declaração de Helsínquia em 1964 (VELOSO, 2009). Em 1975 é elaborada uma nova versão desta declaração que previa a existência de um protocolo aprovado por uma Comissão de Ética Competente (CEC) (LIMA, 2005; VELOSO, 2009).

Em Portugal o Decreto-Lei nº 97/1995 de 10 de maio, definiu as atividades das Comissões de Ética para a Saúde (CES), mas estas apresentavam inúmeras lacunas como é exemplo a formação incompleta dos membros que as constituíam (LIMA, 2005; VELOSO, 2009). Posteriormente, a Diretiva 2001/20/CE de 4 de abril, alterou este paradigma como também antevê a criação de uma comissão de ética para avaliar os ensaios clínicos com medicamentos de uso humano (VELOSO, 2009). A par desta necessidade, surge a Lei nº 46/2004 de 19 de agosto, que a nível nacional transpôs a Diretiva nº 2001/20/CE de 4 de abril, no que respeita à aplicação das Boas Práticas Clínicas (BPC) nos ensaios clínicos com medicamentos de uso humano e cria a CEIC.

A CEIC é um organismo que trabalha de forma independente e é constituída por profissionais da área da saúde e de outras áreas, cuja missão é “assegurar a proteção dos direitos, da segurança e do bem-estar dos participantes nos estudos clínicos e de garantir os mesmos junto da sociedade” (Lei nº 21/2014 de 16 de abril). Apesar de independente, o orçamento da instalação, funcionamento, atividades e recursos humanos são garantidos pela

Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P., - INFARMED (Portaria n° 57/2005 de 20 de janeiro).

Em 1993 é criado em Portugal o Infarmed, Decreto-Lei n° 353/1993 de 7 de outubro, com base no sucesso da proposta feita em 1992 por Fernand Sauer, membro da Comissão Europeia, que antecipava a criação de uma Agência Europeia do Medicamento (EMA) em colaboração com as autoridades reguladoras nacionais (DA SILVA, 2017). Desde então, é um instituto público cientificamente reconhecido a nível nacional e internacional responsável por “regular e supervisionar os setores dos medicamentos de uso humano e dos produtos de saúde, segundo os mais elevados padrões de proteção da saúde pública, e garantir o acesso dos profissionais da saúde e dos cidadãos a medicamentos e produtos de saúde de qualidade, eficazes e seguros” (DA SILVA, 2017; Decreto-Lei n° 46/2012 de 24 de fevereiro).

Atualmente os ensaios clínicos são regulamentados pela Lei da Investigação Clínica n° 21/2014, atualizada pela Lei n° 73/2015 de 27 de julho. Estes devem ser realizados a par dos princípios éticos da Declaração de Helsínquia, BPC e princípios regulamentares.

A condução de um ensaio clínico envolve quatro elementos principais: promotor, investigador, autoridade competente e CEC. O promotor é responsável por realizar, gerir ou financiar o ensaio clínico e por submeter um pedido de autorização à autoridade competente (Infarmed) bem como um Pedido de Parecer para a Realização de um Ensaio Clínico (PPREC) à CEC (CEIC) (CONFERÊNCIA INTERNACIONAL PARA HARMONIZAÇÃO, 2016).

Em Portugal, é permitido iniciar um ensaio clínico após autorização do Infarmed, parecer final favorável da CEIC e autorização da Comissão Nacional de Proteção de Dados (CNPD) (Lei n° 21/2014 de 16 de abril).

Este relatório apresenta uma análise SWOT – *Strengths* (Pontos Fortes), *Weaknesses* (Pontos Fracos), *Opportunities* (Oportunidades) e *Threats* (Ameaças) – acerca do meu estágio curricular no Gabinete de Apoio da CEIC, sediado no Parque da Saúde de Lisboa, na Avenida do Brasil, tal como o Infarmed, sob orientação da Dra. Raquel Silva, Farmacêutica, coordenadora do Gabinete de Apoio e Secretária Executiva da Rede Nacional de Comissões de Ética (RNCEs).



## **ANÁLISE SWOT**

### **Pontos Fortes**

- **Receção e Acolhimento**

O Infarmed apresenta uma Política de Qualidade baseada em quatro eixos dos quais destaco dois: otimização e melhoramento dos processos e eficácia do seu Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ) (INFARMED, I.P., 2017). O SGQ reflete-se nos valores, na missão, nas atividades dos colaboradores e na excelente receção e acolhimento dos estagiários (INFARMED, I.P., 2017).

No dia 8 de janeiro de 2018, fui recebida juntamente com os restantes estagiários pelo Dr. José Viana, membro do departamento de Direção de Recursos Humanos, Financeiros e Patrimoniais (DRHFP) que nos proporcionou uma sessão de boas vindas na sede do Infarmed. Recebi um manual de acolhimento que reúne informação útil sobre o instituto, apresenta os direitos e deveres do estagiário, horário e assiduidade, saúde e segurança no trabalho, entre outros.

Após esta sessão, o Dr. José Viana encaminhou os estagiários para o respetivo departamento, e assim fui conduzida até às instalações da CEIC. Dada a sua independência, encontra-se a desenvolver mecanismos que garantam o cumprimento eficaz dos seus objetivos de forma a implementar um SGQ certificado de acordo com NP EN ISO 9001:2015. Assisti a uma sessão de boas vindas realizada pela Dra. Raquel Silva e no âmbito da sessão, recebi o meu *e-mail* institucional, o meu número mecanográfico e uma cópia do meu plano de estágio curricular, realizado a par do acolhimento e formação da CEIC. O estágio foi planificado para os três meses, o que considero que tenha sido um aspeto positivo na organização das tarefas.

- **Equipa Focada e Motivada**

A equipa do Gabinete de Apoio da CEIC é constituída por seis elementos: uma coordenadora, uma assistente administrativa de direção, duas gestoras de processos e duas gestoras de validação, onde cada colaborador assume uma função principal na equipa. No Anexo I podem ser consultadas as atividades do Gabinete de Apoio da CEIC.

O trabalho desenvolvido apresenta elevada qualidade, uma vez que a CEIC é um *stakeholder* nos ensaios clínicos. Toda a equipa, incluindo eu, tem conhecimento de informações essenciais como *timelines*, *feedback* de promotores, entre outros temas. Reconheço que este conhecimento é sinónimo de estratégia para delinear os objetivos da equipa, incluindo os meus.

- **Acompanhamento**

Esta equipa criou, desde o início, um ambiente bastante confortável para eu manifestar as minhas dúvidas.

De acordo com o artigo 8.º, da Diretiva nº 2001/20/CE 4 de abril, a CEIC desenvolveu e publicou normas orientadoras: listas de verificação, estrutura e organização do *Compact Disc Read-Only Memory* (CD-ROM) entre outros, disponíveis no endereço eletrónico da CEIC. Estes documentos facilitaram bastante a execução das tarefas que me foram propostas, pois fornecem orientações sobre o formato e o conteúdo dos documentos submetidos.

Após três semanas de estágio, foram-me atribuídas diversas funções, que passei a realizar com alguma autonomia, mas com constante acompanhamento e posterior revisão geral da coerência do meu trabalho por parte de um membro da equipa. Assim fui ganhando experiência e nos últimos meses de estágio trabalhei de forma independente, ainda com bastantes questões diárias. Este percurso realizado de forma sequencial proporcionou-me uma evolução progressiva que culminou num estágio bastante desafiante.

- **Contacto com os Requerentes**

A comunicação com os requerentes realizada por *e-mail* ou telefone faz parte do dia a dia da CEIC (Lei nº 21/2014 de 16 de abril). Esta favorece o esclarecimento regulamentar, ético e científico antes da submissão dos pedidos de parecer, evitando a sua invalidação e proporciona uma aproximação dos requerentes com a CEIC.

Em qualquer esclarecimento, é importante avaliar a complexidade da questão e sempre que possível é dada uma resposta no imediato. Esta atividade foi a que considerei mais gratificante pela satisfação dos requerentes, mas no início criou-me algumas inseguranças por falta de bases teóricas e experiência. O conhecimento teórico do MICEF nesta área é muito superficial, o que exigiu um estudo adicional da minha parte. Comecei por responder a pedidos de informação que foram anteriormente colocados e, quando me senti preparada, comecei a responder aos pedidos diários.

Sempre que necessário a CEIC solicita pedidos de esclarecimentos aos requerentes por ofício (enviado por *fax*, correio, Registo Nacional de Estudos Clínicos (RNEC) ou via *e-mail*). Para que o processo seja finalizado, a CEIC solicita uma resposta aos pedidos de esclarecimentos, caso contrário, o processo é arquivado.

A minha atividade foi essencialmente debruçada no envio de pedidos de esclarecimentos por *e-mail*, referentes à atividade de revisão e aprovação de contratos financeiros. Do meu estágio posso concluir que dos vinte e sete contratos que revi, enviei vinte pedidos de

esclarecimentos, isto é 74 % dos contratos requerem algum tipo de esclarecimento perante a CEIC.

Estas atividades promoveram o desenvolvimento de competências de comunicação e organização que, a meu ver, irão facilitar o meu desempenho noutros desafios. As atividades de aplicação de conhecimentos são exemplificadas nos Anexos II e III.

### • **Tarefas no Contexto Profissional**

O primeiro mês de estágio foi dedicado essencialmente à consolidação de informação sobre legislação Nacional e Europeia e Procedimentos Operativos Normalizados (PON) da CEIC.

No decorrer do estágio realizei uma multiplicidade de atividades:

- **Gestão de processos:** Validação em termos administrativos de PPREC com medicamentos de uso humano; Validação em termos administrativos de Pedido de Parecer para a Realização de uma Alteração Substancial (PPAS) com medicamentos de uso humano: formulário de consentimento informado, protocolo, resumo do protocolo, adição de novos centros de ensaio e substituição de um investigador; Gerar ofícios de PPREC e de PPAS na plataforma de Gestão de Ensaios Clínicos da Comissão de Ética para a Investigação Clínica (GECC).
- **Resposta a notificações de processos:** Avaliação de alterações não substanciais (ANS) notificadas pelo promotor/requerente de brochuras do investigador, alterações ao protocolo, cartas aos investigadores e emissão do ofício de resposta; Receção, emissão de ofício de resposta e arquivo de notificações de *Suspected Unexpected Serious Adverse Reaction* (SUSAR) ocorridas em território nacional; Receção, emissão de ofício de resposta e verificação de notificações de início ou encerramento de centros de ensaio e notificações de fim de ensaio clínico; Acuso de notificações de atualização de seguros.
- Elaboração de um Procedimento de SUSAR (Anexo IV);
- Revisão e aprovação de contratos financeiros e solicitação de pedidos de esclarecimentos quando aplicável;
- Resposta a pedidos de informação por *e-mail* ou telefone.

No âmbito do meu programa de estágio, encontra-se no Anexo V um levantamento/ registo numérico das atividades que realizei. O meu contributo para a equipa foi bastante positivo, apesar de curta duração, melhorou bastante os seus *timelines*.

## **Pontos Fracos**

- **Equipa Pequena Aliada à Irregularidade na Intensidade de Trabalho**

O número de submissões de PPREC e PPAS flutua bastante ao longo do ano, uma vez que o trabalho da CEIC depende muito da inovação terapêutica e do decorrer dos ensaios clínicos.

Durante uma semana, do mês de março de 2018, a CEIC recebeu trinta submissões cuja validação foi feita apenas por duas gestoras de validação e três estagiários, além de existirem outras atividades diárias. Os períodos de maior trabalho foram desafiantes para mim pois consegui fazer uma boa gestão do tempo. Quando existia algum tempo livre, este era aproveitado para rever legislação, aprofundar conhecimentos e acompanhar as atividades da equipa da CEIC.

Nos períodos de férias e nos períodos de maior carga de trabalho, constatei que o facto de ser uma equipa pequena requer bastante esforço. Partilhei a minha opinião com a coordenadora e ela também anseia pela abertura de concurso público para a introdução de novos elementos no Gabinete de Apoio da CEIC, mas está estritamente dependente do Ministério das Finanças e do Ministério da Saúde.

- **Seguro e Indemnização**

O seguro de responsabilidade civil deve estar presente num PPREC (Lei nº 21/2014 de 16 de abril). De acordo com a Lei nº 21/2014 de 16 de abril, o promotor é obrigado a contratar um seguro. Nos estudos clínicos com intervenção o período de cobertura do seguro é obrigado a abranger o ano seguinte à sua conclusão.

Durante o estágio verifiquei inúmeras incoerências: seguro não válido à data de submissão, seguro caducado (Anexo III, Contacto telefónico caso I), seguro nominal que não abrange todos os centros de ensaio, entre outras situações. Esta foi a área onde senti mais dificuldades, pois estes conteúdos não estão previstos na componente teórica do MICE, com a agravante de não existir uniformidade na elaboração do certificado de seguro por parte das seguradoras. A CEIC, até ao momento de término do meu estágio, não publicou nenhum modelo orientador para a emissão de certificados de seguro, apesar de se encontrar a reunir esforços. Este documento orientador simplificaria o processo de validação, dificuldade sentida por mim, e uniformizaria a submissão para todos os promotores.

## **Oportunidades**

### **• Formação e Atualização de Conhecimentos**

Durante o estágio recebi diversas formações teóricas e formações *On-Job* realizadas pelos membros do Gabinete de Apoio da CEIC. A oportunidade de formação foi fundamental para fortalecer os meus conhecimentos e adquirir novas competências.

A validação de processos ocupou 41 % da globalidade das minhas tarefas. Esta atividade possibilitou a aquisição de conhecimento diário, uma vez que lia parte da documentação submetida, além de acompanhar a inovação científica.

A oportunidade de assistir a uma reunião de Comissão Executiva (CE) e a uma reunião de plenário permitiu-me adquirir conhecimento científico atual, bem como perceber que a diversidade de conteúdos teóricos adquiridos no MICE, especialmente o da FFUC, conferiu-me valências transponíveis para a prática profissional, onde me sinto capaz de integrar uma equipa multidisciplinar, como é o exemplo do plenário da CEIC.

### **• Constituição de uma Equipa**

A estratégia de trabalho do Gabinete de Apoio da CEIC baseia-se na constituição de equipas entre uma gestora de validação e uma gestora de processos quando se trata de PPREC ou PPAS. Quando se trata de notificações o trabalho é realizado individualmente pelas gestoras de validação.

No final do primeiro mês de estágio, a Dra. Raquel sugeriu que constituísse uma equipa de trabalho com uma das gestoras de processos para que as minhas atividades fossem identificadas e registadas de acordo com o modelo de referência da CEIC: iniciais do nome da gestora de validação / iniciais do nome da gestora de processos quando necessário / tipo de documento / ano / nº de processo / nº CEIC. Aceitei com imensa satisfação este desafio e a partir desse momento fui responsável pelo meu sucesso e pelas minhas falhas.

### **• Participação nas Comemorações dos 25 anos do Infarmed**

De acordo com o Código de Conduta do Infarmed a valorização dos trabalhadores e o espírito de equipa são essenciais para suportar o elevado padrão de qualidade (INFARMED, I.P., 2009).

Enquanto estagiária participei na celebração do 25º aniversário do Infarmed no dia 15 de janeiro de 2018. Os trabalhadores do Infarmed marcaram a presença neste evento vestidos de negro, como sinal de protesto relativamente à deslocalização da sede do Infarmed para a

cidade do Porto, na qual também participei. Sem dúvida que esta celebração foi um marco importante no meu estágio e na minha formação.

- **Registo Nacional de Estudos Clínicos**

A inovação tecnológica ligada à área da saúde tem sofrido um intenso desenvolvimento (APIFARMA, 2016). O Reino Unido, um dos países desenvolvidos no setor dos ensaios clínicos, conta com várias plataformas, desde 2013, para consultar ensaios clínicos permitindo um acesso fácil a esta informação por parte da comunidade (APIFARMA, 2013). A Holanda criou uma plataforma online (*ToetsingOnline*), utilizada para submeter PPREC à entidade competente possibilitando uma comunicação mais eficaz com esta.

Em Portugal, o Registo Nacional de Estudos Clínicos (RNEC) tornou-se exequível a partir de 1 de janeiro de 2017. Tal como o *ToetsingOnline*, facilita a comunicação entre o promotor e a entidade competente. Esta plataforma possibilita o registo e a divulgação de todos os estudos clínicos que se encontram a decorrer em Portugal e passou a ser a única forma de submeter a documentação inerente a cada pedido em formato de CD-ROM virtual (REGISTO NACIONAL DE ESTUDOS CLÍNICOS, 2016). Contudo, a CEIC ainda recebe por correio as notificações e PPAS de estudos clínicos e ensaios clínicos anteriores a 1 de janeiro de 2017.

Considero que a oportunidade de trabalhar com esta plataforma foi bastante vantajosa pela importância que ela representa, pois é utilizada por entidades singulares ou coletivas que realizam estudos clínicos ou que se interessam na sua realização.

## **Ameaças**

- **Pressão Externa**

A CEIC tem um papel fulcral na aprovação de ensaios clínicos pelo que está sujeita a pressão externa por parte dos promotores/requerentes. Enquanto estagiária estive sujeita a esta pressão diária exercida por alguns promotores/requerentes, cujo interesse é obter um parecer favorável da CEIC no menor tempo possível por meios que transgridem os seus procedimentos. Quando ganhei alguma independência esta pressão externa tornou-se uma ameaça. Se existisse algum item que não cumprisse os procedimentos e eu não o detetasse, era distribuído para o perito nessas condições, além de estar em incumprimento com as exigências da CEIC. Considero que esta ameaça terá de ser transformada num desafio que se ultrapassa com conhecimento, espírito crítico e ética profissional.

- **Componente Teórica do MICF**

O facto de ser aluna do MICF da FFUC foi vantajoso em relação a outras universidades, pelos conteúdos teóricos adquiridos na unidade curricular obrigatória de Farmacovigilância e Farmacoepidemiologia. Contudo a fusão de Farmacovigilância e Farmacoepidemiologia numa única unidade curricular reduziu bastante os conteúdos teóricos lecionados.

Até ao ano de 2017 a CEIC recebeu dois estagiários da licenciatura em Farmácia Biomédica e até então, nunca tinha recebido um estagiário do MICF. No dia 8 de janeiro de 2018, recebeu mais dois estagiários da licenciatura em Farmácia Biomédica e eu, a primeira estagiária do MICF. Considero-me privilegiada por ser a primeira, mas esta questão tornou-se uma ameaça perante os meus colegas. O programa da licenciatura em Farmácia Biomédica da FFUC conta com duas unidades curriculares focadas nos ensaios clínicos cuja designação é Ensaio Clínicos I e II (FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA, 2018). Assim, adquirem competências técnicas relevantes nesta área que superam as do MICF.

Reconheço e admiro o esforço da FFUC em melhorar o plano curricular do MICF para o ano letivo 2018/2019, contudo a oferta formativa de unidades curriculares opcionais deveria ser maior com o objetivo de formar farmacêuticos especializados em diversas áreas nas quais somos ultrapassados por outros profissionais, tomando a minha experiência como exemplo.

Neste âmbito, a OF reconhece a necessidade de formar profissionais, especialmente farmacêuticos, na área dos ensaios clínicos ao promover a edição de 2018 do “Programa de Formação em Medicina Farmacêutica e Investigação Clínica” (ORDEM DOS FARMACÊUTICOS, 2018).

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Este estágio curricular foi uma oportunidade única, oferecida pela FFUC, pela responsabilidade exigida e pelo conhecimento adquirido. Ganhei competências que colmataram a abordagem superficial do plano de estudos do MICF na área dos ensaios clínicos.

Realço o apoio de todos os colaboradores na minha aprendizagem e no sucesso do estágio.

A área dos ensaios clínicos em Portugal ainda tem um longo caminho a percorrer, mas quando surgir um portal único Europeu para ensaios clínicos, já previsto desde 2014, é uma oportunidade para Portugal ficar ao mesmo nível de outros países da Europa.

Nos ensaios clínicos e em qualquer outra área onde exista o doente e o medicamento é indispensável a presença do farmacêutico enquanto prestador de cuidados de saúde.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APIFARMA - **Comunicados de imprensa**. 2016. [Acedido a 12 de março de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.apifarma.pt/salaimprensa/comunicados/Paginas/APIFARMA-assinala-Dia-dos-Ensaios-Cli%C3%ADnicos-com-lan%C3%A7amento-de-v%C3%ADdeos-.aspx>
- APIFARMA - **Notícias**. 2013. [Acedido a 12 de março de 2018]. Disponível na Internet: [https://www.apifarma.pt/salaimprensa/noticias/Documents/02%20APIFARMA\\_EstudoECemPortugal\\_ApresentacaoConferencia\\_20130611.pdf](https://www.apifarma.pt/salaimprensa/noticias/Documents/02%20APIFARMA_EstudoECemPortugal_ApresentacaoConferencia_20130611.pdf)
- CEIC - **Documentos submissão**. [Acedido a 08 de março de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.ceic.pt/documentos-submissao>
- CONFERÊNCIA INTERNACIONAL PARA HARMONIZAÇÃO - **Integrated Addendum to ICH E6(R1): Guideline for Good Clinical Practice E6(R2)**. Washington DC: ICH, 2016.
- DA SILVA, J.A. - Vinte e Cinco Anos de Evolução do INFARMED, IP.: Os Atuais Desafios. **Revista Portuguesa de Farmacoterapia**. 9, 2 (2017) 47-49 [Acedido a 05 de fevereiro de 2018]. Disponível na Internet: <http://revista.farmacoterapia.pt/index.php/rpf/article/view/151>
- **Decreto-Lei nº 353/1993 de 7 de outubro**. Diário da República: Série I-A, nº 235.
- **Decreto-Lei nº 46/2012 de 24 de fevereiro**. Diário da República: Série I, nº 40.
- **Decreto-Lei nº 97/1995 de 10 de maio**. Diário da República: Série I-A, nº 108.
- Diretiva nº 2001/20/CE, de 4 de abril. **Jornal Oficial da União Europeia**, L 121, 04.04.2001. [Acedido a 08 de fevereiro de 2018]. Disponível na Internet: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/HTML/?uri=CELEX:32001L0020&from=PT>
- Diretiva nº 2013/55/EU, de 20 de novembro. **Jornal Oficial da União Europeia**, L 354, 28.12.2013. [Acedido a 05 de fevereiro de 2018]. Disponível na Internet: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/HTML/?uri=CELEX:32013L0055&from=PT>
- **Estatuto da Ordem dos Farmacêuticos** - Lei nº 131/2015 de 4 de setembro. Diário da República: Série I, nº 173.



- **FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA - Plano de estudos Licenciatura em Farmácia Biomédica.** 2018. [Acedido a 8 de junho de 2018]. Disponível na Internet: [https://apps.uc.pt/courses/PT/programme/1591/2018-2019?id\\_branch=5041](https://apps.uc.pt/courses/PT/programme/1591/2018-2019?id_branch=5041)
- **INFARMED, I.P. - Documentos institucionais: Organização.** 2009. [Acedido a 12 de março de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/documents/15786/1269448/2940929411.pdf/6d41ff41-871a-4571-88b2-f83687f303d1>
- **INFARMED, I.P. - Planeamento e monitorização de desempenho.** 2017. [Acedido a 03 de março de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/documents/15786/1269504/Plano+Estrat%C3%A9gico+2017-2019/1f490fe2-998a-4e64-bca9-939862f34217>
- **Lei nº 21/2014 de 16 de abril.** Diário da República: Série I, nº 75.
- **Lei nº 46/2004 de 19 de agosto.** Diário da República: Série I-A, nº 195.
- **Lei nº 73/2015 de 27 de julho.** Diário da República: Série I, nº 144.
- **LIMA, C. - Ensaio clínico vulnerabilidade e relativismo ético.** Acta Médica Portuguesa, 18, 3 (2005) 221-226. [Acedido a 04 de março de 2018]. Disponível na Internet: <https://actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/1021/689>
- **ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - Programa de formação em medicina farmacêutica e investigação clínica.** 2018. [Acedido a 05 de maio de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/eventos/programa-de-formacao-em-medicina-farmaceutica-e-investigacao-clinica/>
- **Portaria nº 57/2005 de 20 de janeiro.** Diário da República: Série I-B, nº 14.
- **REGISTO NACIONAL DE ESTUDOS CLÍNICOS - Home.** 2016. [Acedido a 15 de março de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.rnec.pt/31a>
- **VELOSO, A. - História.** 2009. [Acedido a 20 de janeiro de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.ceic.pt/documents/20727/58009/Hist%C3%B3ria/960e81e5-5a88-42ba-acb1-4cd3896f2e20>

## ANEXOS

### ANEXO I

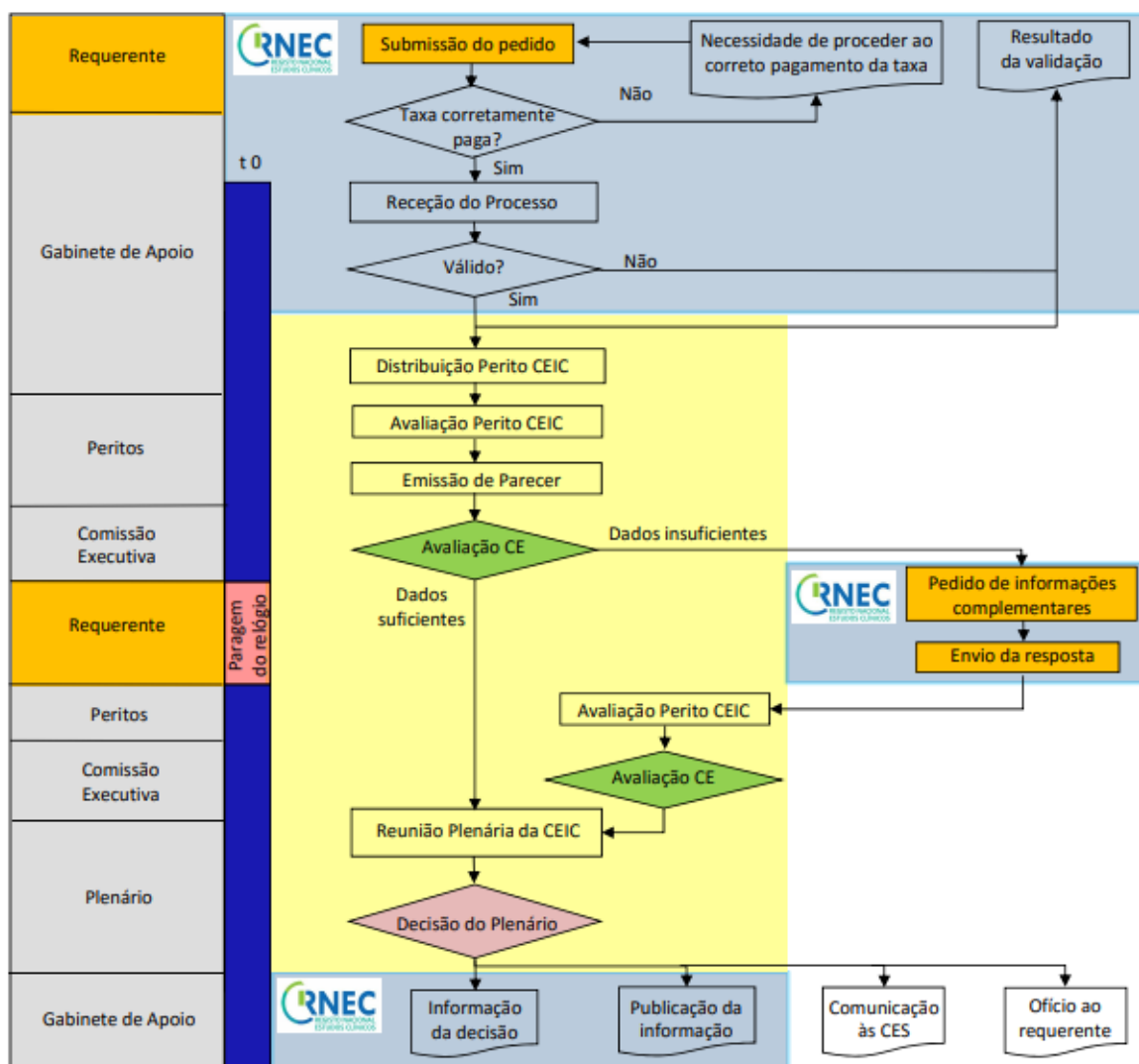


Figura I- Fluxograma de Procedimento da CEIC. (CEIC).

#### Referências bibliográficas:

- CEIC - **Procedimento de Processo: Apresentação do fluxograma de processo de emissão de parecer pela CEIC.** 2015. [Acedido a 06 de março de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.ceic.pt/documents/20727/57540/FLUXOGRAMA+DE+PROCESSO/547fca65-b793-4228-9bf2-a1cfea256c72>

## **ANEXO II**

### Pedidos de informação

#### **E-mail:**

##### **Pergunta I:**

“A investigadora principal do centro x está em licença de maternidade e vamos substituí-la temporariamente pelo investigador x. Devo notificar a mudança de investigador como alteração substancial ou não substancial? Como procedo após ela regressar?”

##### **Resposta I:**

A CEIC deve ser sempre informada quando são incluídos ou retirados elementos da equipa de investigação. A mudança de investigador principal constitui uma alteração substancial e deve ser submetida toda a documentação de forma a fazer cumprir a lista de verificação para PPAS. Quando ela regressar, apenas terá de notificar como uma alteração não substancial ou fazer referência a essa informação num requerimento de uma alteração substancial (CEIC).

#### **Contacto telefónico:**

##### **Pergunta I:**

“Estou a submeter pela primeira vez um PPREC à CEIC. A lista de verificação apresenta o item “Pareceres das Comissões de Ética às quais foi submetido o pedido”. Poderia explicar-me qual a documentação que tenho de apresentar para efeitos de validação?”

##### **Resposta I:**

De acordo com a Lei nº 21/2014 de 16 de abril, artigo 26º, que diz respeito ao procedimento de autorização, a alínea f) refere que, no caso de ser um ensaio clínico multicêntrico que tenham outros centros de ensaios de outros Estados membros da União Europeia, deve apresentar se existirem pareceres das comissões de ética (Lei nº 21/2014 de 16 de abril). Para efeitos de validação basta enviar, para já, uma lista com os países que irão participar e a decisão das respetivas Comissões de Ética. Posteriormente é aceite o envio de ofícios dos pareceres das Comissões de Ética, traduzidos para Língua Portuguesa, ou a CEIC pode solicitá-los se considerar conveniente (CEIC).

#### **Referências bibliográficas:**

- CEIC - **FAQ**. [Acedido a 17 de fevereiro de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.ceic.pt/faq>
- Lei nº 21/2014 de 16 de abril. Diário da República: Série I, nº 75.

## **ANEXO III**

Pedidos de esclarecimentos

**E-mail:**

### **Caso I:**

Na validação técnica de um contrato financeiro de um requerente x, o contrato definitivo submetido do centro x apresentava uma adenda não previamente submetida. Não existia qualquer justificação referente à adenda, além de existirem dois novos elementos na equipa de investigação sem notificação prévia, nem justificação no quadro sinóptico de alterações ao contrato financeiro assinado.

### **Pedido de esclarecimento I:**

Enviei um *e-mail* no sentido de serem feitas alterações à submissão inicial, de forma a ser possível emitir ofício para que a votação e apreciação do parecer em plenária da CEIC se torne exequível para o centro supramencionado.

“Exma. X

Na sequência da revisão do contrato do centro X, EudraCT: x, solicito alguns esclarecimentos da sua parte.

De acordo com a Lei nº 21/2014 de 16 de abril, artigo 12º, ponto 3, que diz respeito ao centro de estudo clínico “o contrato financeiro produz efeitos a partir da notificação do parecer favorável da CEC, desde que o protocolo constante do contrato não tenha sofrido alterações.” (Lei nº 21/2014 de 16 de abril). Neste âmbito, no caso de adendas/emendas ao contrato financeiro, não anteriormente submetidas, deverá ser apresentada a justificação do motivo da sua implementação (CEIC). A justificação para a presente adenda não está presente, pelo que deve existir algum esclarecimento. Mais informo que, a inclusão de dois novos elementos na equipa de investigação deve também ser justificada no quadro sinóptico de alterações ao contrato financeiro assinado, como também deve ser enviada a Declaração do Diretor de Serviço atualizada.

Assim para que o processo seja válido, solicito que envie com maior brevidade o quadro sinóptico de alterações ao contrato financeiro assinado, onde deve listar todas as alterações e respetiva justificação

Aguardo uma resposta da sua parte,

Com os melhores cumprimentos,

Ângela Maximino, Estagiária do Gabinete de Apoio da CEIC”

## **Caso 2:**

Após a receção do requerimento do requerente x com a informação da data de abertura do centro de ensaio e inclusão do primeiro doente procedi à análise dos documentos submetidos de acordo com os procedimentos da CEIC. Verifiquei que a data do ofício de aprovação do contrato emitido pela CEIC era de x de julho de 2017 e o primeiro doente veio a ser aleatorizado a x de setembro de 2016, data anterior à data de emissão do ofício. Após detetar esta inconformidade contactei a Dra. Raquel para decidir qual a melhor forma de contactar com o requerente.

### **Pedido de esclarecimento 2:**

A CEIC é notificada da abertura dos centros de ensaio e/ou inclusão do primeiro doente de acordo com a Lei nº 21/2014 de 16 de abril, o artigo 36º alínea f) refere “competete à CEC assegurar o acompanhamento do estudo clínico desde o seu início até ao seu termo” (Lei nº 21/2014 de 16 de abril). Enviei um *e-mail* no sentido de clarificar a data que pensamos ter sido um lapso.

“Exmo. X

Na sequência da notificação de abertura do centro de ensaio x e inclusão do primeiro doente, EudraCT: x, solicito uma clarificação referente às datas que menciona na carta.

O ofício de aprovação do contrato para o centro de ensaio x foi emitido pela CEIC a x de julho de 2017 e este doente veio a ser aleatorizado a x de setembro de 2016. A dúvida coloca-se dado que a aleatorização de doentes só poderá acontecer após assinatura do formulário de consentimento informado. Todos os procedimentos efetuados ao doente, no âmbito do estudo (nomeadamente para verificação de critérios de inclusão/exclusão) só podem ser feitos após a assinatura do formulário de consentimento informado.

Aguardo uma resposta da sua parte,

Com os melhores cumprimentos,

Ângela Maximino, Estagiária do Gabinete de Apoio da CEIC”

## **Contacto telefónico:**

### **Caso I:**

Na validação de um PPAS de um estudo clínico com intervenção, cuja razão de alteração era uma atualização da Brochura do Investigador, um dos itens de validação é sempre o seguro. Ao pesquisar os *outputs* no GECC verifiquei que o período de cobertura não se encontrava

atualizado. O estudo clínico em questão esteve sem seguro durante um mês. Se não fosse submetido este PPAS talvez não fosse detetada esta inconformidade. O disposto na lei “não constitui fundamento para eximir o promotor, o investigador, os membros da respetiva equipa de investigação e o centro de estudo clínico das formas de responsabilidade disciplinar, civil, contraordenacional ou penal” (Lei nº 21/2014 de 16 de abril).

#### **Pedido de informação 1:**

Contactei o requerente alertando-o para a regularização desta situação com maior brevidade possível. Questionei-o acerca da justificação que poderia ser apresentada e a resposta foi o esquecimento da renovação do seguro. Solicitei o envio do certificado de seguro até ao dia seguinte. Estes casos acontecem especialmente em estudos clínicos de longa duração ou cujo período de estudo foi estendido.

#### **Caso 2:**

Na validação administrativa de um PPAS verifiquei que o este cumpria todos os requisitos legais, de acordo com uma lista de verificação, contudo existia uma pequena inconformidade. Neste caso contactei o requerente por telefone, contudo se elementos de maior importância não cumprirem os requisitos o processo é invalidado e terá de ser resubmetido (CEIC).

A inconformidade era a presença de um farmacêutico no contrato financeiro que não constava na equipa de investigação da declaração das condições do centro de ensaio.

#### **Pedido de informação 2:**


Contactei o requerente para dar conhecimento da pequena inconformidade do processo e solicitei o envio de uma nova declaração das condições do centro de ensaio com a equipa de investigação correta, tal como constava no contrato financeiro e na declaração dos serviços farmacêuticos. Terá um prazo máximo de três úteis dias para enviar a declaração. Se tal não ocorrer o processo é invalidado.

#### **Referências bibliográficas:**

- CEIC - **FAQ**. [Acedido a 17 de fevereiro de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.ceic.pt/faq>
- Lei nº 21/2014 de 16 de abril. Diário da República: Série I, nº 75.

## ANEXO IV

### Procedimento de SUSAR

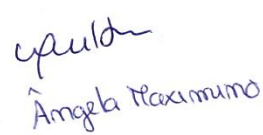
  
**Procedimento SUSAR**  
(Suspected Unexpected Serious Adverse Reaction)

*Este procedimento aplica-se a todas as SUSARs cujo critério de gravidade não seja <morte>. Todas as notificações que envolvam a morte do participante deverão ser são avaliadas por um perito da CEIC.*

Descrição do procedimento:


1. Receção de Relatório de SUSAR (RNEC, e-mail, CD ou suporte papel)
  - Se via RNEC, e-mail ou CD, deve imprimir o relatório de SUSAR.
  
2. Preencher a base de dados EXCEL
  - Eudract /Protocolo (Consultar relatório de SUSAR);
  - Medicamento(s) ou Dispositivo(s) (Consultar relatório de SUSAR 14);
  - Fase (Consultar 7 + 13 SUSAR. Quando existem dúvidas deve procurar no GECC → XML → E. General Information on the Trial → E7 );
  - Código CEIC (Código do PPREC com parecer favorável);
  - Fonte CÓD (CE2) e Nome (SUSAR);
  - Data de Receção;
  - Tipo de Relatório (Inicial ou Followup X Consultar relatório SUSAR 25a);
  - Gestora (Consultar GECC → Dados de Ensaio);
  - Critério de Gravidade da Reação Adversa (Consultar relatório de SUSAR 8-12);
  - Código SUSAR (Consultar relatório de SUSAR 24b);
  - Perito (Consultar GECC → Dados de Ensaio);
  - Decisão (Arquivo) e Data de arquivo.
  
3. Arquivar no GECC

**NOTA:** se for recebida por RNEC ou e-mail primeiro é necessário registar a entrada de documentos no GECC: Registo de Entrada de Documentos → N° Eudract / Protocolo → Tipo de documentos (SUSAR) → N° de CDs → N° de Volumes → Recebido por Correio → Data/Hora;




CEIC - Comissão de Ética para a Investigação Clínica  
Parque de Saúde Lisboa-Av. do Brasil, 53 Pav.17A  
1749-004 Lisboa  
Telefone: +351 217985340 Fax: +351 211117544 Website: www.ceic.pt E-mail: ceic@ceic.pt  
**PROCEDIMENTO SUSAR** | Elaborado: Ângela Maximino, Estagiária do Gabinete de Apoio da CEIC


Figura 2- Procedimento SUSAR.



REPÚBLICA  
PORTUGUESA  
SAÚDE



SNS  
SERVIÇO NACIONAL  
DE SAÚDE



ceic  
Comissão de Ética para a Investigação Clínica  
National Ethics Committee for Clinical Research

- GECC → Ensaios → Gestão → N° Eudract / Protocolo → Gestão → Próxima atividade ( Act. Registo de Documentos Sem Regras Próprias) → Tipo de Documento (SUSAR) → Texto a Enviar ( ex.: MFR CONTROL NO. <código SUSAR> - < Tipo de Relatório >) → Seleccionar Ocorrência associada.

**Nota:** após proceder aos passos acima mencionados, deve carregar o relatório de SUSAR no campo de [Documento], sempre que estiver disponível em suporte digital.

4. Gravar e Gerar Doc;

5. Histórico de Documentos

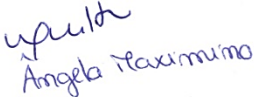
- Imprimir Ofício em Papel Timbrado (Impressora- Tabuleiro 2);

6. Escrever no documento em papel do relatório de SUSAR:

- Data do ofício (informação presente no ofício);
- Nossa Ref.: (informação presente no ofício).

**NOTA:** se o relatório de SUSAR for recebido por RNEC, antes de proceder à entrega da documentação (ofício e relatório SUSAR) a uma das gestoras de validação, deve ser colocado um *post-it* com a informação <RNEC>.

CEIC - Comissão de Ética para a Investigação Clínica  
Parque de Saúde Lisboa- Av do Brasil, 53-Pav.17A  
1749-004 Lisboa  
Telefone: +351 217985340 Fax: +351 211117544 Website: www.ceic.pt E-mail: ceic@ceic.pt



Ângela Maximino

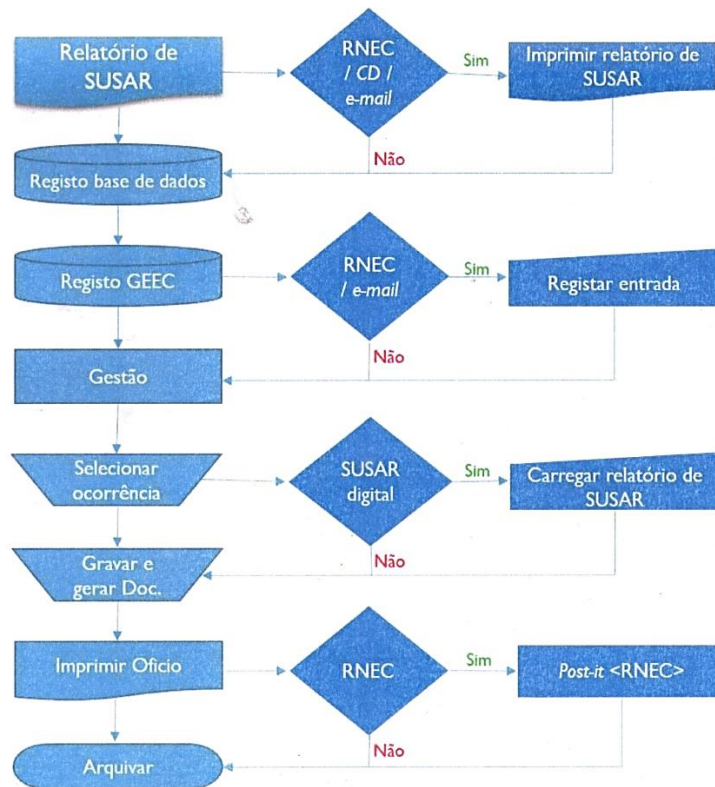
**PROCEDIMENTO SUSAR** | Elaborado: Ângela Maximino, Estagiária do Gabinete de Apoio da CEIC

**Figura 3-** Procedimento SUSAR. (Continuação).





**Fluxograma:**



CEIC - Comissão de Ética para a Investigação Clínica  
Parque de Saúde Lisboa-Av. do Brasil, 53-Pav.17A  
1749-004 Lisboa  
Telephone: +351 217985340 Fax: +351 211117544 Website: www.ceic.pt E-mail: ceic@ceic.pt

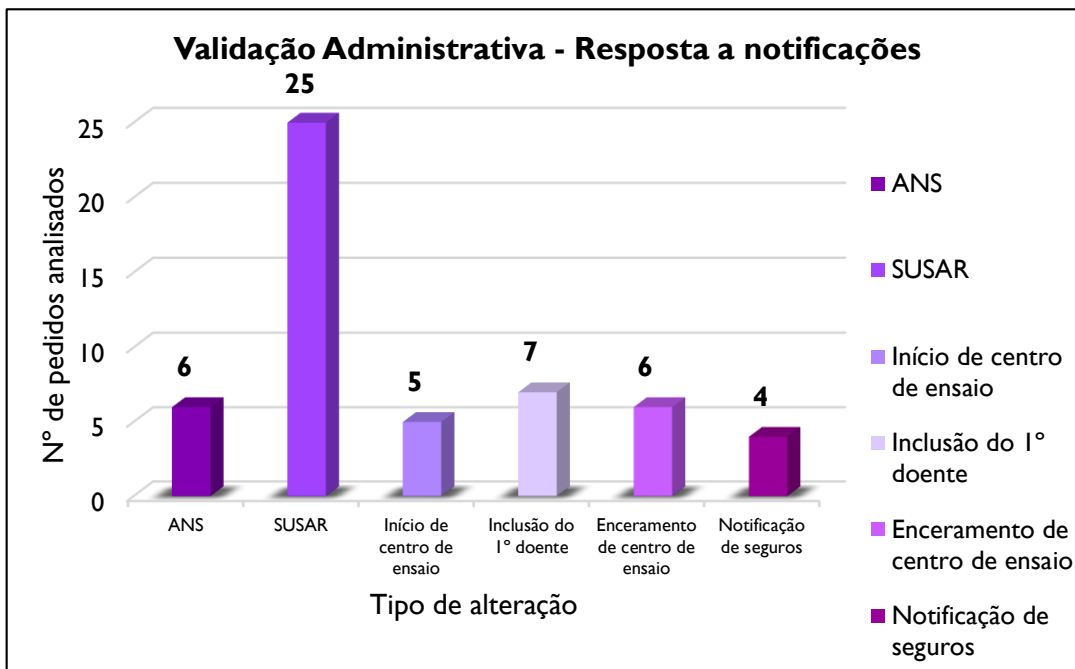
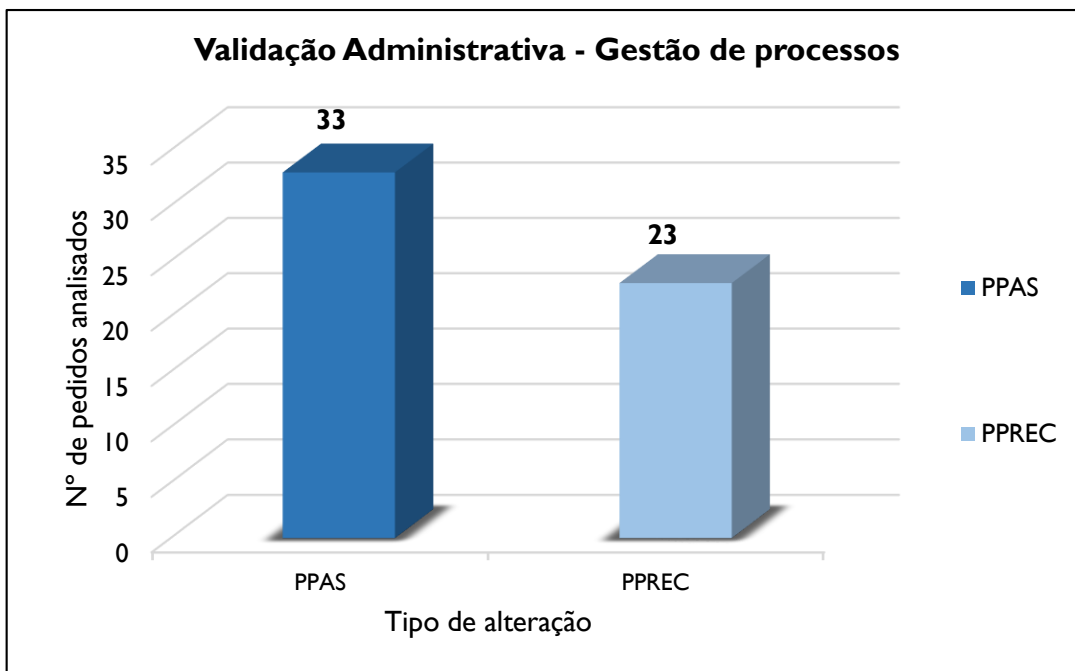
PROCEDIMENTO SUSAR | Elaborado: Ângela Maximino, Estagiária do Gabinete de Apoio da CEIC

*Upulda  
Ângela Maximino*

**Figura 4-** Procedimento SUSAR. (Continuação).

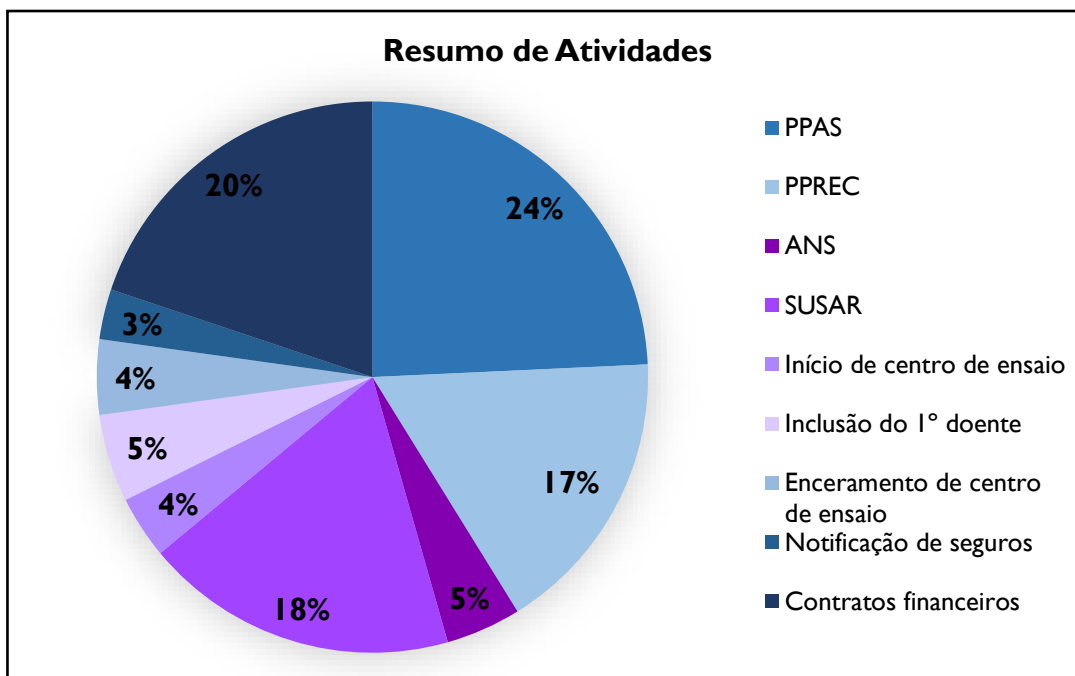
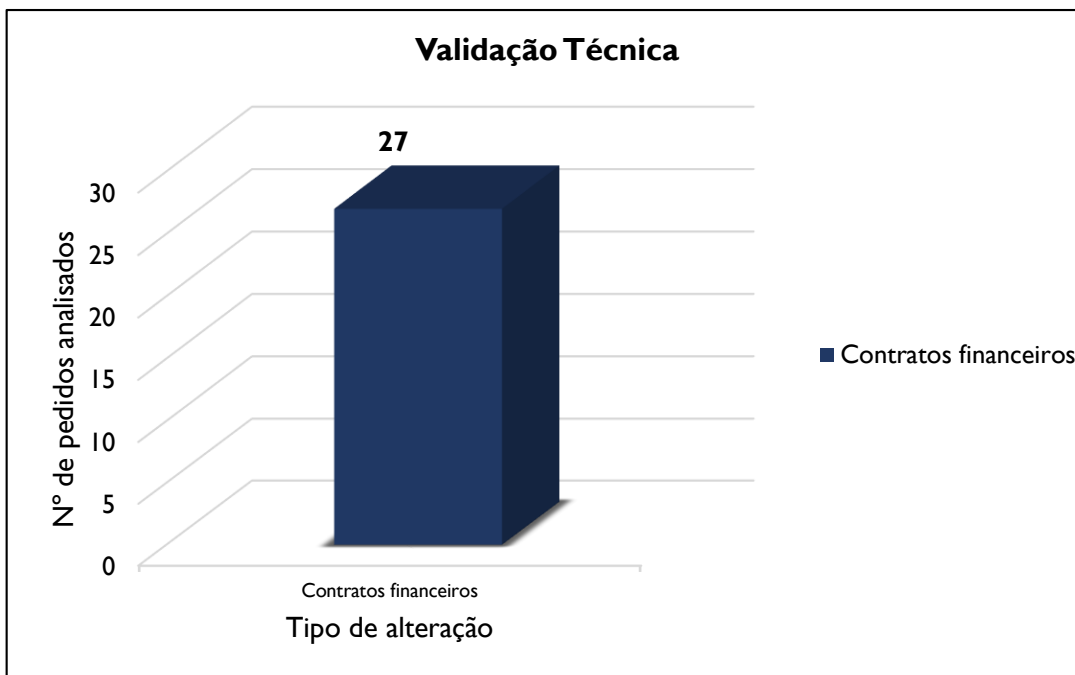
## ANEXO V

Levantamento/registo numérico das atividades realizadas



## ANEXO V

Levantamento/registo numérico das atividades realizadas (*Continuação*)



## **PARTE II**

### Relatório de Estágio na Farmácia Holon Campo Grande

Orientadora:

Dra. Carla Lopes Gonçalves

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BDNP</b>	Base de Dados Nacional de Prescrições
<b>CHLN</b>	Centro Hospitalar Lisboa Norte
<b>CNPEM</b>	Código Nacional para a Prescrição Eletrónica de Medicamentos
<b>COE</b>	Contraceção Oral de Emergência
<b>CV</b>	Risco Cardiovascular
<b>DCI</b>	Denominação Comum Internacional
<b>FEFO</b>	<i>First Expiring, First Out</i>
<b>FFUC</b>	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
<b>MICF</b>	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
<b>MNSRM</b>	Medicamento Não Sujeito a Receita Médica
<b>MNSRM-EF</b>	Medicamento Não Sujeito a Receita Médica de Dispensa Exclusiva em Farmácia
<b>MSRM</b>	Medicamento Sujeito a Receita Médica
<b>OF</b>	Ordem dos Farmacêuticos
<b>PIM</b>	Preparação Individualizada da Medicação
<b>PSA</b>	<i>Prostate Specific Antigen</i>
<b>RCM</b>	Resumo das Características do Medicamento
<b>SCORE</b>	<i>Systematic Coronary Risk Evaluation</i>
<b>SNS</b>	Serviço Nacional de Saúde
<b>SWOT</b>	<i>Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats</i>
<b>UC</b>	Universidade de Coimbra
<b>VHB</b>	Vírus da Hepatite B
<b>VHC</b>	Vírus da Hepatite C
<b>VIH</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana

## INTRODUÇÃO

A Farmácia Comunitária do século XXI, é muito diferente da antiga Farmácia de Oficina, assim designada, porque a sua atividade era essencialmente debruçada na preparação de medicamentos (ORDEM DOS FARMACÊUTICOS). Hoje, a par da estrutura do Serviço Nacional de Saúde (SNS), este setor articula-se perfeitamente com as necessidades da população desde os serviços farmacêuticos prestados às diferentes áreas de atuação: Dermocosmética; Cuidados Capilares; Medicina Familiar; Nutrição; Higiene Oral, Bebê e Mamã; Podologia; Veterinária, entre outros serviços.

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) é o culminar do percurso académico que possibilita a transposição dos conteúdos teóricos para a prática profissional, proporciona a aquisição de novas competências e concretiza a intervenção social que hoje é tão importante (Diretiva 2013/55/EU de 20 de novembro).

Saí da minha área de conforto, e no dia 4 de abril de 2018, iniciei o meu estágio curricular numa farmácia do grupo Holon, a Farmácia Holon Campo Grande, Lisboa, sob orientação da Dra. Carla Gonçalves, Diretora Técnica, e com término no dia 31 de julho de 2018.

O grupo Holon surgiu em 2008 com um conceito inovador e hoje é constituído por 392 farmácias (GRUPO HOLON, 2018a). A palavra Holon tem origem no termo grego *Holos*, que significa inteiro (GRUPO HOLON, 2012). A sua missão é “desenvolver uma marca de farmácias orientadas para a prestação de um serviço de excelência à comunidade, baseado num modelo inovador e sustentável” (GRUPO HOLON, 2012). A Farmácia Holon Campo Grande destaca-se por cumprir todos os direitos e deveres do grupo, sendo uma farmácia de referência. As pessoas, a experiência, o rigor, a cumplicidade, a boa disposição e o espírito aberto são os seus maiores valores, razão pela qual escolhi esta farmácia (GRUPO HOLON, 2012).

Este relatório apresenta uma análise SWOT – *Strengths* (Pontos Fortes), *Weaknesses* (Pontos Fracos), *Opportunities* (Oportunidades) e *Threats* (Ameaças) – acerca do meu estágio na Farmácia Holon Campo Grande.

## **ANÁLISE SWOT**

### **Pontos Fortes**

- **Localização**

A Farmácia Holon Campo Grande situa-se no Campo Grande, Rua Cipriano Dourado, 414 C - Lisboa, junto à saída da estação Campo Grande (linha verde) do Metropolitano de Lisboa, um local estratégico com boa visibilidade e acessibilidade. Na sua proximidade encontra-se o Estádio José Alvalade, Sede da NOS Comunicações, Faculdades da Universidade de Lisboa e dois hospitais do Centro Hospitalar Lisboa Norte (CHLN): Hospital de Santa Maria e o Hospital de Pulido Valente.

A sua localização, aliada ao horário de funcionamento ao público 24 horas por dia e 365 dias por ano, permite usufruir de uma grande afluência de utentes diversificados. A grande afluência possibilitou a realização de muitos atendimentos, no período entre 20 de maio de 2018 e 31 de julho de 2018, aspeto que contribui bastante para a minha aprendizagem pelo facto de lidar com muitas situações, dando como exemplo dois casos clínicos do Anexo I, que demonstram a aplicação de conhecimentos.

Muitos dos utentes são ocasionais, mas também há um grande número de utentes habituais que possuem ficha de cliente na farmácia. Este contexto assumiu-se como um ponto forte no meu estágio uma vez que exigiu a fidelização de utentes ocasionais em relação à concorrência, e um acompanhamento farmacoterapêutico individualizado aos que já tinham ficha de cliente, de forma a trocar uma receita médica ou um simples pedido por uma solução de saúde que contribui para uma melhor qualidade de vida.

- **Equipa Holon**

Enquanto grupo inovador, o grupo Holon, acredita que o farmacêutico “enquanto prestador de serviços, exerce uma profissão livre” com um papel fundamental na qualidade do atendimento prestado (ORDEM DOS FARMACÊUTICOS, 1995). Em concordância com o Decreto-Lei nº 307/2007 de 31 de agosto, artigo 23º, esta equipa é constituída por treze farmacêuticos, dois técnicos de farmácia e um técnico auxiliar de farmácia. A Dra. Carla Gonçalves é uma líder com elevado desempenho que motiva a equipa diariamente para que sejam alcançados os diversos objetivos. A conquista do Prémio Almofariz 2017 na categoria “Farmácia do Ano” é um exemplo do seu sucesso (NETFARMA, 2017). O modelo de gestão operacional do grupo enfatiza o espírito de equipa com diversos desafios atualizados mensalmente, de acordo com o organograma que representa a estrutura da organização por

áreas de responsabilidade (GRUPO HOLON, 2012). Estas são sete: marketing e comunicação, projetos e serviços, intervenção farmacêutica, produtos Holon, atendimento, portfólio e qualidade.

De acordo com o Decreto-Lei nº 307/2007 de 31 de agosto, “o pessoal que desempenha funções de atendimento ao público nas farmácias deve estar devidamente identificado, mediante o uso de um cartão, contendo o nome e o título profissional”. A FFUC oferece aos seus alunos esse cartão, contudo no primeiro dia de estágio a farmácia forneceu-me um cartão personalizado das farmácias Holon que me identificava enquanto estagiária. Este pequeno pormenor, foi um passo importante na minha integração.

O espírito de equipa e a disponibilidade imediata de cada colaborador manifestou-se logo aquando da realização das primeiras atividades administrativas e de gestão e posteriormente no atendimento ao público. Este fator de trabalho colaborativo foi essencial ao longo de todo o estágio, onde pude sempre esclarecer dúvidas, debater opiniões e crescer enquanto futura farmacêutica.

A equipa foi sem dúvida um ponto forte no meu estágio, pois além de jovem e com bom ambiente de trabalho valoriza a atividade de cada estagiário que acolhe conferindo-lhe diversas responsabilidades ao longo dos quatro meses.

### • **Dispensa de Medicamentos com Robot**

A farmácia dispõe de um *robot* (APOSTORE®) onde são armazenados a maioria dos Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM), exceto os medicamentos de frio e outros medicamentos ou dispositivos médicos cuja dimensão não permite o seu armazenamento (ex.: dispositivo de libertação intrauterino Mirena®), enquanto que os Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) são arrumados nos lineares e em locais apropriados no *backoffice*. A regra FEFO (*First Expiring, First Out*) é realizada automaticamente pelo *robot*, facilitando a atividade do farmacêutico.

De acordo com relatório internacional da *Grad View Research* (2016) estima-se um crescente aumento do mercado global da robótica em Farmácia Comunitária e Hospitalar até 2020.

O *robot* maximizou a eficiência e a qualidade do meu estágio, não só no primeiro mês aquando do armazenamento dos produtos, mas também quando passei para o atendimento.

O armazenamento dos medicamentos no *robot* é bastante intuitivo, pois basta inserir o prazo de validade do medicamento, passar o Código Nacional para a Prescrição Eletrónica de Medicamentos (CNPEM) pelo leitor ótico e colocar na prateleira.



No atendimento, o *robot* entrega o medicamento quando o farmacêutico pretende através da integração do *Winphar* com o *robot* pela tecla f10. Assim, consegui realizar um aconselhamento mais personalizado e com maior fluidez. O habitual armazenamento de medicamentos em colunas de gavetas numa estrutura sólida, realidade que existia na farmácia onde realizei o meu estágio de verão da Universidade de Coimbra (UC) de 140 horas, potenciou-me algum nervosismo, sensação não presenciada no presente estágio curricular. O contacto com esta nova realidade permitiu eliminar o nervosismo associado à procura do medicamento, melhorando a empatia e a gestão da comunicação em cada atendimento.

A dispensa de medicamentos, uma das atividades que está prevista no conteúdo do ato farmacêutico, pode ser facilitada com a entrega dos medicamentos pelo *robot*, uma vez que economiza tempo, promove uma maior interação e envolvimento utente-farmacêutico, além de ser apelativo (ORDEM DOS FARMACÊUTICOS, 1995).

- **Atendimento Diferenciado**

As farmácias Holon apresentam um modelo de atendimento especializado e diferenciado, onde o farmacêutico sai do balcão e dirige-se ao utente que entra na farmácia cumprimentando-o com uma saudação e uma pergunta “Posso ajudar?” (GRUPO HOLON, 2012). Em seguida o utente é acompanhado até ao balcão de atendimento personalizado, onde compete ao farmacêutico ter um papel ativo no aconselhamento. Este atendimento é um elemento diferenciador das farmácias que pertencem ao grupo, apesar de não ser sempre exequível (GRUPO HOLON, 2012).

Enquanto estagiária considero que este atendimento é bastante dinâmico além de transmitir empatia logo desde o primeiro contacto. Devo realçar o quão foi gratificante receber inúmeras respostas de “Sim, claro que pode!”, sempre que questioneei “Posso ajudar?”. Por outro lado, o papel ativo que é exigido no atendimento estimulou a necessidade de aprender e consolidar conhecimentos de forma a manter a diferenciação do serviço prestado. Neste sentido utilizei bastante os protocolos de aconselhamento farmacêutico fornecidos pela farmácia, nomeadamente os de MNSRM.

- **Programa de Estágio**

O estágio foi planeado de forma a abranger três áreas: gestão de produtos, aconselhamento/dispensa de medicamentos e conferência de receituário. Antes da realização de qualquer tarefa, um colaborador realizava uma formação *On-Job* com duração de trinta minutos, de forma a que os procedimentos fossem realizados convenientemente. O primeiro mês foi dedicado à receção, conferência e armazenamento de encomendas. Realizei o controlo de prazos de validade e procedi à devolução de lotes de medicamentos e produtos de dermocosmética retirados do mercado. Considero que foi um ponto forte iniciar pela execução destas tarefas de forma a conhecer o *stock* da farmácia. Paralelamente, comecei a realizar a medição de parâmetros bioquímicos, iniciando assim o contacto com os utentes.

No segundo mês de estágio comecei por ver atendimentos ao balcão, posteriormente realizei atendimentos com supervisão e, por fim, procedi de forma autónoma. A última tarefa que realizei foi a conferência de receituário, nomeadamente receitas manuais de acordo com a Portaria nº 224/2015 de 27 de julho. A execução desta tarefa requer alguma exigência de forma a detetar possíveis erros de dispensa, além de exigir a conferência da entidade financeira responsável. Esta atividade ajudou-me não só a detetar erros, mas também a ganhar alguma destreza na legibilidade das receitas.

Considero um ponto forte o planeamento e organização do estágio que, a meu ver, facilitou o meu progressivo crescimento.

## **Pontos Fracos**

- **Medicamentos Manipulados**

Um medicamento manipulado é “qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico” (Portaria nº 594/2004 de 2 de junho). A Farmácia Holon Campo Grande recebe poucos pedidos de medicamentos manipulados, razão pela qual deixou de realizar a sua produção. Quando é recebida alguma receita de um medicamento manipulado é estabelecido o contacto com outra farmácia do grupo, Farmácia Holon BPlanet, que realiza a sua preparação de acordo com as boas práticas (INFARMED, I.P., 2016). É calculado o preço através dos critérios instituídos pela Portaria nº 769/2004 de 1 de julho, e posteriormente é enviado para a farmácia de forma a satisfazer a reserva (INFARMED, I.P., 2016).

Considero que este tenha sido um ponto fraco do meu estágio uma vez não observei nem realizei a preparação de medicamentos manipulados, apesar de ter algumas bases teóricas e

práticas conferidas pela unidade curricular de Farmácia Galénica do MICEF. Assim, no laboratório da farmácia apenas realizei a reconstituição de preparações extemporâneas.

- **Cartão Saúde**

Saúde é uma “saúde com atitude positiva”, este é o significado do nome do cartão Saúde das Farmácias Portuguesas (FARMÁCIAS PORTUGUESAS, 2018a). Este cartão gratuito permite que o “utente ganhe um ponto por cada euro em compras iguais ou superiores a três euros”, na primeira compra do dia na farmácia (FARMÁCIAS PORTUGUESAS, 2018b). Os pontos são válidos por um ano e podem ser trocados por serviços farmacêuticos, produtos de bem-estar e MNSRM (FARMÁCIAS PORTUGUESAS, 2018b).

A Farmácia Holon Campo Grande não aderiu a este programa, causando alguns constrangimentos aquando do atendimento, uma vez que o utente não consegue usufruir das vantagens deste cartão.

Considero ser este também um ponto fraco, uma vez que lidei com situações desagradáveis pois os utentes são cada vez mais exigentes, mais informados, mais refinados e com maior capacidade de escolha. As farmácias Holon, tal como criaram protocolos de abordagem e aconselhamento, também deveriam criar um protocolo para dar resposta a esta situação.

## **Oportunidades**

- **Formações**

A política de qualidade das farmácias Holon requer o “envolvimento de todos os colaboradores com qualificações adequadas e atualizadas, com investimento na gestão e formação dos recursos humanos” (GRUPO HOLON, 2018b). A aquisição de competências permite que a equipa se torne mais forte e mais competitiva.

Como farmácia modelo do grupo Holon, recebe semanalmente formações internas realizadas por Delegados de Informação Médica com a duração de trinta minutos. Além de apresentarem as novidades das marcas, também reveem conceitos científicos esquecidos e esclarecem dúvidas pertinentes. Realizei formações internas dos produtos Ecophane Biorga<sup>®</sup>, Aptamil<sup>®</sup>, Daflon<sup>®</sup>, Scholl's<sup>®</sup>, pílulas contraceptivas e Contraceção Oral de Emergência (COE) do laboratório *Richter Gedeon Pharmaceuticals* e formações externas da marca Uriage<sup>®</sup> (linha completa HYSÉAC e AGE PROTECT), Klorane<sup>®</sup> (linha completa), René Furterer<sup>®</sup> (linha completa), Avène<sup>®</sup> (proteção solar). Além destas formações, a farmacêutica responsável pela prestação do serviço de dermocosmética em várias farmácias do grupo, realizou formações

teóricas *On-Job* sobre dermatite atópica, manchas e imperfeições, psoríase e escoriações. A oportunidade de realizar um curso *e-learning* creditado pela Ordem dos Farmacêuticos (OF), oferecido aos membros da farmácia sobre “Gestão da Comunicação em Farmácia” ajudou-me imenso na forma de comunicar, bem como no *merchandising* e vendas associadas.

Acredito que a formação e atualização científica está na génese do sucesso. Com a participação nas diversas formações senti maior facilidade em transpor os conceitos teóricos em escolhas acertadas para o utente, em comparação com os produtos/marcas que não tive formação. Considero que o conhecimento e a capacidade de apresentar vantagens dos produtos influencia bastante a decisão do utente. Esta afirmação baseia-se no facto de inicialmente, ainda sem formação nem opinião crítica consolidada, o meu aconselhamento de produtos substitutos ficava aquém das expectativas.

### • **Serviços Farmacêuticos Prestados**

Segundo Pedro Pires, fundador do grupo Holon, os serviços farmacêuticos foram implementados nestas farmácias porque o utente é mais importante que *marketing* de venda (MAURITTI, 2017).

A prestação de serviços cresceu e hoje, apesar do baixo incentivo político, a equipa da Farmácia Holon Campo Grande presta dez serviços: Consulta Farmacêutica; Preparação Individualizada da Medicação (PIM); *Check Saúde* (colesterol, pressão arterial, glicémia, *Prostate Specific Antigen* - PSA e triglicéridos); Pé Diabético; Podologia; Dermofarmácia; Aconselhamento ao Viajante; Cessão Tabágica; Nutrição e Administração de Vacinas e Injetáveis. Apesar do Despacho n° 2522/2018 de 1 de março, permitir a realização de “testes *point of care* de rastreio de infeções por Vírus da imunodeficiência humana (VIH), vírus da hepatite C (VHC) e vírus da hepatite B (VHB)”, a farmácia ainda não apresenta, até ao momento, procedimentos, recursos humanos e logística para realizar estes testes (INFARMED, I.P., 2018a). Neste contexto, creio que num curto espaço de tempo este serviço será assegurado aos utentes.

Os serviços são prestados em dois gabinetes de atendimento personalizado de acordo com a Deliberação n° 1502/2014 de 30 de julho, artigo 2º, e com o conceito e divisão espacial das farmácias deste grupo, Anexo II (GRUPO HOLON, 2012).

O serviço que gostei mais de realizar foi a PIM, gestão da terapêutica, destinada a idosos polimedicados que residem em Lisboa e que se encontram em condições de isolamento social. Dados de 2017 revelam que 41 % dos australianos com idade superior a cinquenta e dois anos tomam medicação crónica e 78 % destes falham pelo menos um medicamento por dia (THE

PHARMACY GUILD OF AUSTRALIA, 2017). No Anexo III, encontra-se um exemplo de uma PIM.

A oportunidade de acompanhar a realização destes serviços pela equipa, bem como executá-los numa fase mais tardia, acrescentou bastante valor ao meu estágio. Esta excelente oportunidade comprovou que a intervenção farmacêutica é cada vez mais importante nos cuidados de saúde primários.

A farmácia aderiu ao programa de “troca por troca” de seringas de forma a diminuir a transmissão de doenças infecciosas. Na entrega de duas seringas usadas na farmácia, cada utente (pessoa que utiliza drogas injetáveis) recebe um *kit* com “duas seringas, dois toalhetes, duas ampolas de água bidestilada, duas carteiras com ácido cítrico, dois filtros, dois recipientes e um preservativo” (SERVIÇO NACIONAL DE SAÚDE, 2017). O elevado número de utentes sensibilizou-me e no curto espaço de tempo que estes estão na farmácia, é urgente dizer pelo menos “é importante trazer sempre a seringa usada para troca e não partilhar a seringa, agulha ou qualquer outro material” (SERVIÇO NACIONAL DE SAÚDE, 2017).

### • **Intervenção na Comunidade**

O grupo de projetos e serviços e o grupo de intervenção farmacêutica da Farmácia Holon Campo Grande dedicam-se à intervenção social desenvolvendo várias iniciativas para a comunidade, desde rastreio, formações nas escolas e feiras de saúde. Participei no rastreio que decorreu no mês de maio, mês do coração, “a prevenção na linha da frente”. Este rastreio consistia em avaliar o risco cardiovascular (CV) a utentes entre os 40 e 65 anos com base no SCORE (*Systematic Coronary Risk Evaluation*) (DIREÇÃO GERAL DA SAÚDE, 2015). A escala SCORE avalia o risco absoluto de desenvolver uma doença cardiovascular fatal num período de dez anos (DIREÇÃO GERAL DA SAÚDE, 2015).

No agrupamento de escolas Alto do Luminar realizei três ações de formação a alunos do terceiro ciclo, com o tema “métodos contraceptivos”. Percecionei que existiam muitas dúvidas sobre este tema, sendo essencial o nosso papel na evicção de comportamentos de risco. Por fim, no dia 30 de maio, participei na feira do Dia Mundial da Criança, no Jardim Campo das Amoreiras, onde ensinámos os passos essenciais para uma boa higiene oral.

Estas atividades de proximidade com a sociedade estão muito na base da minha realização profissional e pessoal e na forte esperança de que o meu esforço, juntamente com o de outros profissionais, se reflita em melhor e mais saúde.

- **MICF e Realidade Profissional**

O MICF, é um curso interdisciplinar e extremamente completo em que, de um modo geral, todas as unidades curriculares contribuem para a nossa formação. Apesar de ser um curso excessivamente teórico, considero que proporciona diversas oportunidades e conduz a um excelente desempenho em diferentes áreas. Concluo que esta realidade se deve ao rigor, exigência e qualidade do curso que, ano após ano, nos permite crescer enquanto futuros profissionais.

## **Ameaças**

- **Sistema Informático WinPhar**

O sistema informático que a farmácia utiliza é o *Winphar*. Não conhecia este programa, mas adaptei-me bastante bem. O *Winphar* é excelente para atividades de gestão e *back office*, contudo no atendimento não ajuda muito, tornando-se numa ameaça, pois não coloca na mesma janela a informação de contraindicações, frases de segurança ou outros alertas, características típicas do SIFARMA 2000<sup>®</sup>. Enquanto estagiária, senti alguma falta de suporte no aconselhamento, tendo de recorrer muitas vezes ao Resumo das Características do Medicamento (RCM) *online*. Para além disso, torna-se ainda uma ameaça porque o SIFARMA 2000<sup>®</sup> é o sistema informático mais usado pelas Farmácias Portuguesas, com o qual tive apenas oportunidade de trabalhar no *Pharmacareer*.

- **Prescrição de Medicamentos por DCI**

A prescrição de medicamentos por Denominação Comum Internacional (DCI) é a forma com que o receituário deve ser prescrito, exceto se apresentadas justificações técnicas, de acordo com a Lei n.º 11/2012 de 08 de março e Portaria n.º 137-A/2012 de 11 de maio (INFARMED, I.P., 2018b). Para além da DCI deve constar também a forma farmacêutica, dosagem, apresentação ou tamanho de embalagem e posologia (INFARMED, I.P., 2018b). Enquanto estagiária, esta prescrição facilita-me a identificação do grupo terapêutico do medicamento, pois não tenho conhecimento prévio de marcas comerciais, mas para o doente esta prescrição não é de fácil compreensão. A título de exemplo, quando o utente perguntava “este da linha um é o Dexaval<sup>®</sup>?” tentava contornar a situação, verificava no sistema e depois respondia.

Quando o utente não sabe o que toma, se tiver ficha de cliente na farmácia, pelo histórico terapêutico conseguimos identificar a marca ou genérico que ele toma habitualmente. Na farmácia existe alguma falta de regras na criação de fichas, coexistindo duas fichas para o

mesmo utente, situação que dificultou a pesquisa e o acompanhamento individualizado. Alertei a equipa para este facto de forma a facilitar a pesquisa.

- **Prescrição Manual**

A partir de julho de 2015, a prescrição de medicamentos, dispositivos médicos, alimentação especial, entre outros, deve ser efetuada via eletrónica (INFARMED, I.P., 2018c). A prescrição eletrónica receita sem papel/receita eletrónica desmaterializada ou receita eletrónica materializada são as duas formas de prescrição mais comuns na farmácia. A primeira prescrição é “acessível e interpretável por equipamentos eletrónicos”, enquanto que na segunda “a prescrição é impressa, ou seja, no momento de prescrição, os *softwares* têm de validar e registar a receita na Base de Dados Nacional de Prescrições (BDNP)” (INFARMED, I.P., 2018c). A prescrição manual pode ser usada excecionalmente nos casos previstos pela Portaria nº 224/2015 de 27 de julho.

Identifico com facilidade os elementos que devem constar numa receita manual, nomeadamente as suas especificidades, contudo torna-se uma ameaça a legibilidade da receita. Durante o meu estágio, pela inexperiência em contactar com estas receitas, antes da dispensa, a receita era sempre validada por um farmacêutico. A maioria das vezes pedi ajuda a um membro da equipa para conseguir identificar o(s) medicamento(s) prescrito(s), situação desagradável para o utente uma vez que o atendimento era mais demorado, além de impossibilitar a minha independência.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O estágio curricular facultou-me ferramentas imprescindíveis para realizar um atendimento rigoroso, exemplar e assertivo. É o culminar de uma longa etapa que visa preparar profissionais de saúde para novos desafios.

A Farmácia Comunitária é cada vez mais um espaço de cuidados de saúde primários, onde o farmacêutico é responsável por contribuir positivamente para o SNS.

Acredito que a Farmácia Comunitária do futuro possa ser uma saída profissional bastante atrativa, uma vez que ainda existem muitas vertentes a explorar.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Decreto-Lei nº 307/2007 de 31 de agosto.** Diário da República: Série I, nº 168.
- **Deliberação nº 1502/2014 de 30 de julho.** Diário da República: Série II, nº 145.
- **Despacho nº 2522/2018 de 1 de março.** Diário da República: Série II, nº 50.
- DIREÇÃO GERAL DA SAÚDE - **Norma nº 005/2013 de 21 de março, 21 de maio de 2015.** Ministério da Saúde. 2015. [Acedido a 15 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0052013-de-19032013.aspx>
- Diretiva nº 2013/55/EU de 20 de novembro. **Jornal Oficial da União Europeia**, L 354, 28.12.2013. [Acedido a 26 de fevereiro de 2018]. Disponível na Internet: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013L0055&from=PT>
- FARMÁCIAS PORTUGUESAS (2018a) - **Uma marca que Saúda a Saúde.** 2018. [Acedido a 18 de maio de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.farmaciasportuguesas.pt/sauda/a-marca-sauda>
- FARMÁCIAS PORTUGUESAS (2018b) - **Como funciona o cartão Saúda?.** 2018. [Acedido a 18 de maio de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.farmaciasportuguesas.pt/sauda/como-funciona>
- GRAND VIEW RESEARCH - **Pharmacy Automation Devices Market to Grow at 7.3% CAGR from 2014 to 2020.** 2016. [Acedido a 3 de junho de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-pharmacy-automation-market>
- GRUPO HOLON - **Brochura Institucional.** 2012. Acessível na Farmácia Holon Campo Grande, Lisboa.
- GRUPO HOLON (2018a) - **Universo Holon.** 2018. [Acedido a 28 de maio de 2018]. Disponível na Internet: [http://www.grupo-holon.pt/pt/public/universo\\_holon](http://www.grupo-holon.pt/pt/public/universo_holon)
- GRUPO HOLON (2018b) - **Política de Qualidade.** 2018. [Acedido a 28 de maio de 2018]. Disponível na Internet: [http://www.grupo-holon.pt/pt/public/universo\\_holon](http://www.grupo-holon.pt/pt/public/universo_holon)
- INFARMED, I.P. - **Medicamentos manipulados.** 2016. [Acedido a 05 de março de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/inspecao/inspecao-medicamentos/medicamentos-manipulados>



- INFARMED, I.P. (2018a) - **Realização de testes rápidos (testes *point of care*) de rastreio de infeções por VIH, VHC e VHB nas farmácias comunitárias e nos laboratórios de patologia clínica/análises clínicas (Despacho n° 2522/2018)**. 2018. [Acedido a 07 de julho de 2018]. Disponível na Internet: [http://www.infarmed.pt/web/infarmed/infarmed/-/journal\\_content/56/15786/2611201](http://www.infarmed.pt/web/infarmed/infarmed/-/journal_content/56/15786/2611201)
- INFARMED, I.P. (2018b) - **Normas relativas à prescrição de medicamentos e produtos de saúde**. 2018. [Acedido a 15 de julho de 2018]. Disponível na Internet: [http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/Normas\\_Prescri%C3%A7%C3%A3o/bcd0b378-3b00-4ee0-9104-28d0db0b7872](http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/Normas_Prescri%C3%A7%C3%A3o/bcd0b378-3b00-4ee0-9104-28d0db0b7872)
- INFARMED, I.P. (2018c) - **Normas relativas à dispensa de medicamentos e produtos de saúde**. 2018. [Acedido a 15 de julho de 2018]. Disponível na Internet: [http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/Normas\\_Prescri%C3%A7%C3%A3o/bcd0b378-3b00-4ee0-9104-28d0db0b7872](http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/Normas_Prescri%C3%A7%C3%A3o/bcd0b378-3b00-4ee0-9104-28d0db0b7872)
- **Lei n° 11/2012 de 08 de março**. Diário da República: Série I, n° 49.
- MAURITTI, M. - **Holon já faz negociações a nível mundial**. 2017 [Acedido a 20 de maio de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.jornaleconomico.sapo.pt/noticias/holon-ja-faz-negociacoes-a-nivel-mundial-233988>
- NETFARMA - **Prémios Almofariz**. 2017. [Acedido a 26 de fevereiro de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.netfarma.pt/pages/premios-almofariz>
- ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **A Farmácia Comunitária**. [Acedido a 26 de maio de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>
- ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos**. 1995. [Acedido a 29 de maio de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.ceic.pt/documents/20727/38736/C%C3%B3digo+Deontol%C3%B3gico+da+Ordem+dos+Farmac%C3%A8uticos/0e2861ff-ab1f-4368-b6b8-ed097ba4eda3>
- **Portaria n° 137-A/2012 de 11 de maio**. Diário da República: Série I, n° 92.
- **Portaria n° 224/2015 de 27 de julho**. Diário da República: Série I, n° 144.
- **Portaria n° 594/2004 de 02 de junho**. Diário da República: Série I-B, n° 129.
- **Portaria n° 769/2004 de 1 de julho**. Diário da República: Série I-B, n° 153.

- SERVIÇO NACIONAL DE SAÚDE - **Programa De Troca De Seringas Nas Farmácias (PTS)**. 2017. [Acedido a 15 de julho de 2018]. Disponível na Internet: [http://spms.min-saude.pt/wp-content/uploads/2017/12/2017.07.19\\_PTS\\_Fluxograma2017.pdf](http://spms.min-saude.pt/wp-content/uploads/2017/12/2017.07.19_PTS_Fluxograma2017.pdf)
- THE PHARMACY GUILD OF AUSTRALIA - **Healthy Futures Report 2017**. 2017. [Acedido a 15 de junho de 2018]. Disponível na Internet: <https://mccrindle.worldsecuresystems.com/blog/2017/03/Pharmacy%20Guild%20Infographic-v02.pdf>

## ANEXOS

### ANEXO I

#### Casos Práticos em Farmácia Comunitária

##### **Caso Prático I:**

Uma senhora de 45 anos, dirigiu-se à farmácia e refere que após realizar uma colonoscopia foi detetada um Hemorroida interna de grau I. Indica que já tem uma consulta médica em outubro, mas devido ao emprego na restauração passa muito tempo em pé e está muito aflita.

##### Intervenção farmacêutica:

Questionei a utente para tentar identificar há quanto tempo estes sintomas persistiam, à qual ela responde seis meses. Ao referir que trabalhava na restauração, questionei-a há quanto tempo trabalhava nesta profissão e se tinha outros sintomas associados ou alguma doença. Refere que trabalha como empregada de balcão há quinze anos e já sente as pernas pesadas e cansadas e acrescenta ter arritmia cardíaca e toma há dois anos propranolol. Questionei se o incómodo da hemorroida era sentido durante todo o dia ou apenas quando defecava. Acaba por descrever sintomas associados a uma situação de obstipação.

Comecei por propor **medidas não farmacológicas** de forma a corrigir os sintomas de obstipação como aumentar o conteúdo de fibras ingeridas (fruta, cereais), diminuir o consumo de hidratos de carbono, realizar banhos de assento com água tépida durante quinze minutos pelos menos uma vez por dia, evitar beber café (bebia dois cafés por dia), usar roupa íntima de algodão e evitar o uso de papel higiénico. Sugeri as Hemofarm<sup>®</sup> Toalhitas para a sua higiene, uma vez que são compostas por água de Hamamélis (adstringentes) que irão aliviar o ardor e prurido.

Posteriormente indiquei **medidas farmacológicas** com ação local e sistémica. Para atuar a nível local indiquei o uso de uma pasta cutânea, sem vasoconstritor local salvaguardando alguma interação com doenças cardiovasculares (Resumo das Características do Medicamento Hemofissural<sup>®</sup>). A pasta que sugeri é composta por extrato de Hamamélis (adstringentes), óxido de zinco (protetor, cicatrizantes, adstringente), dióxido de titânio (adstringentes) e cloridrato de tetracaína (anestésico), a Hemofissural<sup>®</sup>, aplicando com a ajuda da cânula 1 ou 2 vezes por dia (Resumo das Características do Medicamento Hemofissural<sup>®</sup>). Sugeri que fizesse um suplemento de HolonPlus Psyllium<sup>®</sup> tomando 2 comprimidos antes das

principais refeições de forma a regular o trânsito intestinal, pois as fezes duras causam dor ao defecar. Como a consulta era só em outubro, de forma a obter um efeito sistémico aconselhei a toma de Daflon 500<sup>®</sup> fazendo a posologia de crise hemorroidária: “nos 4 primeiros dias: 6 comprimidos revestidos por película repartidos em 3 tomas; nos 3 dias seguintes: 4 comprimidos revestidos por película repartidos em 2 tomas; em seguida voltar à posologia de manutenção: 2 comprimidos revestidos por película por dia” (Resumo das Características do Medicamento Daflon 500<sup>®</sup>). O Daflon 500<sup>®</sup> é constituído por flavonóides extraídos de Rutáceas, bioflavonóides, com propriedades venotrópicas de forma a realizar um reforço ao nível das veias (Resumo das Características do Medicamento Daflon 500<sup>®</sup>).

Para as pernas cansadas, sintoma não valorizado, sugeri a utilização de meias ou *collant* de compressão e a aplicação do creme Cedraflon<sup>®</sup> até quatro vezes por dia (CEDRAFLON<sup>®</sup>). O Cedraflon<sup>®</sup> é usado no alívio do desconforto das pernas cansadas graças ao extrato de Cidra de Córsega (*Citrus medica vulgaris*) e mentol (CEDRAFLON<sup>®</sup>).

## **Caso Prático 2:**

Uma senhora com 32 anos dirigiu-se à farmácia e pede uma pílula do dia seguinte e deseja falar com alguém em privado.

### Intervenção farmacêutica:

Atualmente na Farmácia Comunitária existem duas opções de COE por ordem crescente de eficácia: (1) Norlevo<sup>®</sup> ou Postinor<sup>®</sup> (levonorgestrel indicado para utilização em relações sexuais desprotegidas com intervalo inferior a setenta e duas horas); (2) ellaOne<sup>®</sup> (acetato de ulipristal indicado para utilização em relações sexuais desprotegidas com intervalo superior a setenta e duas horas e inferior a cento e vinte horas) (ORDEM DOS FARMACÊUTICOS, 2015).

Direcionei a utente para um dos gabinetes e neste local mais reservado começamos a dialogar. Comecei por saber há quanto tempo a relação sexual desprotegida ocorreu à qual ela responde “quatro dias”. Perante esta situação fica excluída a Norlevo<sup>®</sup> ou Postinor<sup>®</sup> que são classificados quanto à dispensa MNSRM e opta-se pela ellaOne<sup>®</sup> Medicamento Não Sujeito a Receita Médica De Dispensa Exclusiva em Farmácia (MNSRM-EF) (INFARMED, I.P., 2016).

Na continuidade da conversa questionei se fazia alguma contraceção hormonal diariamente e esta refere “Não, fui mãe há quatro meses e não tomo a pílula nem utilizei

preservativo”. Continuei a fazer mais perguntas “Amamenta o seu bebé? Toma algum medicamento para o estômago? Tem asma ou alguma outra doença? Em que fase do ciclo menstrual se encontra?”. Acabei por concluir que amamentava o bebé e seguidamente alertei para o facto de não poder dar leite materno ao bebé durante sete dias após a toma da ellaOne<sup>®</sup>, pois esta é excretada no leite, mas deveria continuar a tira-lo com uma bomba de forma a manter a produção de leite (Resumo das Características do Medicamento ellaOne<sup>®</sup>). Esta informação causou-lhe algum pânico pois teria de passar a alimentar o bebé apenas com o leite Aptamil<sup>®</sup> I.

A utente não tomava nenhum medicamento, nem tinha nenhuma doença e a fase do ciclo menstrual também não sabia precisar. Alertei para o facto de poder atrasar a menstruação até dois dias e no caso de vomitar ou ter algum episódio de diarreia, nas três horas seguinte à toma de ellaOne<sup>®</sup>, teria de realizar uma nova toma (Resumo das Características do Medicamento ellaOne<sup>®</sup>; ORDEM DOS FARMACÊUTICOS, 2015).

Apresentei algumas sugestões para evitar uma gravidez não desejada como ir a uma consulta de ginecologia o mais breve possível e usar o preservativo feminino e/ou masculino.

### Referências bibliográficas:

- INFARMED, I.P. - **Lista de DCI identificadas pelo Infarmed como MNSRM-EF e respetivos protocolos de dispensa.** 2016. [Acedido a 22 de julho de 2018]. Disponível na Internet: [http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/autorizacao-de-introducao-no-mercado/alteracoes\\_transferencia\\_titular\\_aim/lista\\_dci](http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/autorizacao-de-introducao-no-mercado/alteracoes_transferencia_titular_aim/lista_dci)
- ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Boas Práticas de Farmácia Comunitária – Norma específica sobre a intervenção farmacêutica na Contraceção de Emergência.** 2015. [Acedido a 21 de julho de 2018]. Disponível na Internet: [https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/norma\\_especifica\\_sobre\\_a\\_intervencao\\_farmaceutica\\_na\\_contracecao\\_de\\_emergencia\\_7929677925ab147ce85c39.pdf](https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/norma_especifica_sobre_a_intervencao_farmaceutica_na_contracecao_de_emergencia_7929677925ab147ce85c39.pdf)
- **Resumo das Características do Medicamento Daflon 500.** Infomed. [Acedido a 21 de julho de 2018]. Disponível na Internet: [http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=2302&tipo\\_doc=fi](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=2302&tipo_doc=fi)
- **Resumo das Características do Medicamento ellaOne 500.** EMA. [Acedido a 22 de julho de 2018]. Disponível na Internet: [http://www.ema.europa.eu/docs/pt\\_PT/document\\_library/EPAR\\_Product\\_Information/human/001027/WC500023670.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_Product_Information/human/001027/WC500023670.pdf)
- **Resumo das Características do Medicamento Hemofissural.** Infomed. [Acedido a 21 de julho de 2018]. Disponível na Internet: [http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=4168&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=4168&tipo_doc=rcm)
- CEDRAFLON® - **Alguma pergunta?.** [Acedido a 26 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.cedraflon.pt/>

## ANEXO II



**Figura I** - Fluxo e circuitos das farmácias Holon. (GRUPO HOLON, 2012).

### Referências bibliográficas:

- GRUPO HOLON - **Brochura Institucional**. 2012. Acessível na Farmácia Holon Campo Grande, Lisboa.

**ANEXO III**

Exemplo de uma Preparação Individualizada da Medicação (PIM)



Nome: \_\_\_\_\_

Tel./TLM: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Farmácia: \_\_\_\_\_

Farmacêutico: \_\_\_\_\_

Tel./TLM: \_\_\_\_\_

Médico assistente: \_\_\_\_\_

**Terapêutica dentro do Blister:**

Medicamento		Posologia						Medicamento	
Nome	Validade	JJ	PA	AL	LA	JT	DT	Forma	Cor
<b>Copalia</b> (Amlodipina 5 mg + Valsartan 80 mg)	11/2020		I					Redondo	Amarelo
<b>Atarax</b> (Hidroxizina 25 mg)	12/2022						I	Oval	Branco
<b>Icandra</b> (Metformina 1000 mg + Vildagliptina 50 mg)	02/2019		I			I		Oval	Amarelo
<b>Triflusal 300 mg</b>	06/2019		I					Cápsula	Branca
<b>Alopurinol 300 mg</b>	09/2022			I				Redondo	Branco
<b>Crestor</b> (Rosuvastatina 10 mg)	05/2020						I	Redondo	Rosa
<b>Furosemida 40 mg</b>	09/2022		I					Redondo	Branco
<b>Combodart</b> (Dutasterida 0.5 mg + Tansulosina 0.4 mg)	04/2020		I					Cápsula	Vermelho e Rosa
<b>Omeprazol 20 mg</b>	02/2020	I						Cápsula	Laranja e azul
<b>Topiramato 25 mg</b>	01/2020						I	Oval	Branco

Levantei a minha medicação no dia \_\_/\_\_/\_\_\_\_, o utente  
 \_\_\_\_\_ dispensado por \_\_\_\_\_





## **Parte III**

### **Monografia Intitulada “Estratégias de Nanoimunoterapia em Oncologia”**

Orientador:

Professor Doutor João Nuno Sereno Almeida Moreira

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>aAPCs</b>	<i>artificial Antigen Presenting Cells</i>
<b>APCs</b>	Células apresentadoras de antígenos
<b>ATC</b>	<i>Adoptive T cell therapy</i>
<b>AuNPs</b>	Nanopartículas de ouro
<b>C</b>	Região constante
<b>CAR</b>	<i>Chimeric Antigen Receptor</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>CNP</b>	<i>Nanotube-polymer composite</i>
<b>CNTs</b>	Nanotubos de carbono
<b>CpG-DNA</b>	Oligonucleótido de DNA
<b>CTL</b>	Células T citotóxicas
<b>CTLA-4</b>	<i>Cytotoxic T-lymphocyte associates protein-4</i>
<b>DCs</b>	Células dendríticas
<b>DINP</b>	<i>Dual immunotherapy nanoparticles</i>
<b>ECM</b>	Matriz extracelular
<b>EMA</b>	Agência Europeia do Medicamento
<b>EPR</b>	Efeito reforçado da permeabilidade e retenção
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b>	Magnetite
<b>HER2</b>	Recetor do fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2
<b>HSCs</b>	Células estaminais hematopoiéticas
<b>IDO</b>	Indolamina-2,3-dioxigenase
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferão-gama
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	Interferão-alfa
<b>IL</b>	Interleucina
<b>iTAMs</b>	<i>Iron-loaded TAMs</i>
<b>IV</b>	Intravenosa
<b>LAG-3</b>	<i>Lymphocyte activation gene-3</i>
<b>LbL</b>	<i>Layer-by-Layer</i>
<b>mAB</b>	Anticorpo monoclonal
<b>MDSCs</b>	Células supressoras de origem mielóide
<b>MGIu-HPG</b>	<i>3-methylglutarylated hyperbranched poly(glycidol)</i>
<b>MHC</b>	Complexo <i>Major</i> de Histocompatibilidade

<b>MNPs</b>	Nanopartículas magnéticas
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>MSC</b>	Células mesenquimais do estroma
<b>MSNPs</b>	Nanopartículas mesoporosas de sílica
<b>nano-aAPCs</b>	<i>Nanoscale artificial Antigen Presenting Cells</i>
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>NSCLC</b>	Cancro de pulmão de não pequenas células
<b>OVA</b>	Ovalbumina
<b>PAMPs</b>	Padrões moleculares associados a agentes patogénicos
<b>PD-1</b>	Recetor de morte celular programada
<b>PD-L1</b>	Ligando do recetor de morte celular programada 1
<b>PD-L2</b>	Ligando do recetor de morte celular programada 2
<b>PEG</b>	Poli(etileno glicol)
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PHA</b>	<i>PEG-histidine-modified alginate</i>
<b>PLA</b>	Ácido poliláctico
<b>PLGA</b>	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
<b>pMHC</b>	Péptidos acoplados ao Complexo <i>Major</i> de Histocompatibilidade
<b>RBCs</b>	Glóbulos vermelhos hemolíticos
<b>siRNA</b>	RNA de interferência/silenciamento
<b>SRE</b>	Sistema reticuloendotelial
<b>STING</b>	<i>Stimulator of Interferon Genes</i>
<b>SWCNTs</b>	Nanotubos de carbono de parede simples
<b>TAA</b> s	Antígenos associados ao tumor
<b>TAM</b> s	Macrófagos imunossupressores associados ao tumor
<b>TCR</b>	Recetor dos linfócitos T
<b>TGF-β</b>	Fator de crescimento transformante beta
<b>Th</b>	Células T <i>helper</i>
<b>TIL</b> s	Linfócitos infiltrantes de tumor
<b>TIM-3</b>	<i>T cell immunoglobulin-3</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptor</i>
<b>TLRL</b>	<i>Toll-like receptor ligand</i>
<b>TME</b>	Microambiente tumoral

<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>Tregs</b>	Células T reguladoras
<b>TRX</b>	<i>3,5-didodecyloxybenzamide</i>
<b>V</b>	Região variável
<b>VEDFR</b>	Recetor do fator de crescimento vascular endotelial
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento vascular endotelial

## I- Sistema Imunitário

### I.1- Introdução

A Imunologia é um dos ramos da ciência médica que estuda o sistema imunitário, também designado por imune ou imunológico (ABBAS *et al.*, 2016).

A importância do sistema imunitário para a saúde é enfatizada quando existem respostas imunológicas ineficazes que frequentemente colocam a vida em perigo (ABBAS *et al.*, 2016).

A proteção conferida pelo sistema imunitário é desencadeada graças ao reconhecimento e à resposta imunológica. A capacidade de diferenciar o “próprio” do “não próprio”, reconhecer padrões de grupos patogênicos e ainda distinguir células alteradas do hospedeiro passíveis de desencadear tumores fazem parte do reconhecimento (ABBAS *et al.*, 2016).

As respostas imunológicas são mediadas por células da linhagem mielóide e células da linhagem linfóide, provenientes de células estaminais hematopoiéticas (HSCs). Na linhagem mielóide destacam-se os leucócitos polimorfonucleares ou granulócitos (basófilos, eosinófilos e neutrófilos) e os monócitos mononucleares que circulam no sangue e, após entrarem nos tecidos, diferenciam-se em macrófagos ou células dendríticas (DCs) (AROSA *et al.*, 2012). Os linfócitos mononucleares derivam da linhagem linfóide e conferem respostas imunológicas específicas. As células T e B, constituem as duas grandes famílias de linfócitos e ainda existe a família dos linfócitos *Natural Killer* (NK) ou células NK (AROSA *et al.*, 2012).

### I.2- Imunidade Inata e Adaptativa

A resposta imunológica é constituída pela imunidade inata, responsável pela proteção imediata em minutos/horas (até doze horas após a infecção inicial) e a imunidade adaptativa, de longo prazo (dois a cinco dias após a infecção inicial) (ABBAS *et al.*, 2016; ZANG *et al.*, 2017).

A imunidade inata inclui barreiras físicas (pele e membranas mucosas), barreiras químicas (várias proteínas plasmáticas, pH, entre outros) e barreiras celulares (vários tipos de células) (ABBAS *et al.*, 2016). As principais células envolvidas na imunidade inata são fagócitos (neutrófilos, monócitos e macrófagos), DCs e células NK (ZANG *et al.*, 2017). Estas células constituem a primeira linha de defesa do organismo e são capazes de reconhecer substâncias compartilhadas por classes de microrganismos, os padrões moleculares associados a agentes patogênicos (PAMPs). O reconhecimento destes padrões é realizado através de recetores específicos do tipo *Toll Like* (TLR), *Scavenger*, Tipo C (exemplo: recetores de manose), entre outros (ABBAS *et al.*, 2016; ZANG *et al.*, 2017). As células NK ainda fazem parte da primeira linha de defesa e produzem citocinas citotóxicas como o interferão-alfa (IFN- $\alpha$ ) e a interleucina-2 (IL-2) e promovem a morte celular direta.

A ligação entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa é realizada através de células apresentadoras de antígenos (APCs) como macrófagos e DCs (MALE *et al.*, 2013). As APCs são especializadas no processamento de antígenos, que consiste na captura e posterior degradação proteolítica de antígenos solúveis (AROSA *et al.*, 2012). Os peptídeos (antígenos) resultantes da degradação proteolítica são apresentados à superfície das APCs via Complexo *Major* de Histocompatibilidade (MHC), de forma a serem reconhecidos por células T, informação detalhada no ponto 1.3 (ZANG *et al.*, 2017).

A imunidade adaptativa é a segunda linha de defesa do organismo que exige proliferação clonal de células T e B em órgãos e tecidos diferenciados (MALE *et al.*, 2013). Pode ser classificada em dois tipos, a imunidade humoral, mediada por anticorpos produzidos por células B, e a imunidade celular, mediada por células T que reconhecem antígenos unicamente via moléculas de MHC (ABBAS *et al.*, 2016).

A imunidade adaptativa implica o reconhecimento de antígenos por recetores de células T e B, ao contrário da resposta de largo espectro conferida pela imunidade inata (ZANG *et al.*, 2017). Após a resposta primária a um antígeno são produzidas células T e B de memória que atuam com prontidão numa segunda imunização ao mesmo antígeno, característica ausente na imunidade inata (ABBAS *et al.*, 2016).

### **1.3- Células T**

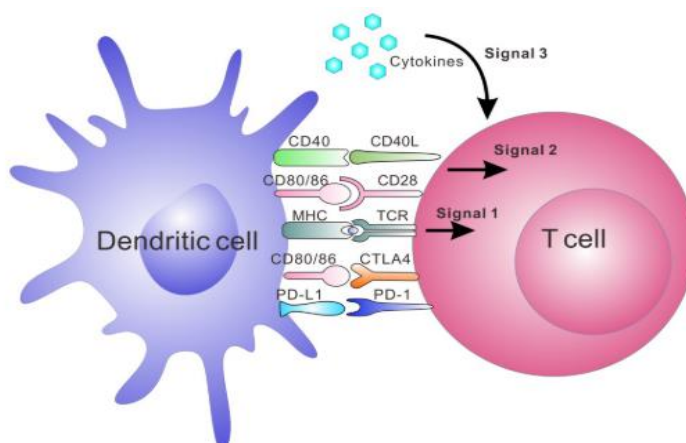
São vários os órgãos e tecidos que intervêm na resposta imunológica. Nos órgãos linfóides primários - timo e medula óssea - ocorre a maturação das células T e B, respetivamente (ABBAS *et al.*, 2016). Após esta etapa migram para os órgãos linfóides secundários - gânglios linfáticos, baço e tecido linfóide associado às mucosas - onde ocorre a diferenciação de células T *naive* em células efetoras e de memória, por reconhecimento de antígenos apresentados por DCs, como também ocorre a diferenciação de células B *naive* por reconhecimento de antígenos solúveis (ABBAS *et al.*, 2016).

O reconhecimento de antígenos pela maioria das células T (90 % a 95 %) envolve um heterodímero formado por uma cadeia  $\alpha$  e uma cadeia  $\beta$ , cada uma delas constituída por uma região variável (V) e uma região constante (C), o TCR (AROSA *et al.*, 2012). Também é expresso um complexo de sinalização, o CD3 (*Cluster of differentiation 3*), cuja região citoplasmática permite a transmissão e posterior transdução intracelular do sinal (AROSA *et al.*, 2012).

As células T podem ser reconhecidas pela presença de proteínas da membrana (ZANG *et al.*, 2017). Simultaneamente com a expressão do complexo TCR e CD3, a expressão do co-

recetor CD4 define células T auxiliares ou *helper* (Th ou também denominadas por células TCD4<sup>+</sup>) e a expressão do co-recetor CD8 define células T citotóxicas (CTL ou também denominadas por células TCD8<sup>+</sup>) (AROSA *et al.*, 2012; ZANG *et al.*, 2017).

A ativação de células T *naive* requer dois sinais, sendo que o sinal 1 consiste na ligação do TCR:CD3 a moléculas de MHC (KOSMIDES *et al.*, 2017). Ao existir apenas este sinal é desencadeada anergia ou apoptose, sendo necessário um segundo sinal, sinal 2, acessório, mediado por um recetor co-estimulatório como o CD28, Figura 1 (AROSA *et al.*, 2012). Nas células TCD4<sup>+</sup> o primeiro sinal envolve a ligação TCR:CD3 a moléculas de MHC II enquanto que nas células TCD8<sup>+</sup> é estabelecida a ligação TCR:CD3 a moléculas de MHC I (ABBAS *et al.*, 2016). O segundo sinal envolve essencialmente a ligação do recetor B7 (B7-1 ou também conhecido por CD80 e B7-2 ou também conhecido por CD86) das DCs ao recetor co-estimulatório CD28 promovendo a sua ativação, Figura 1 (AROSA *et al.*, 2012). Embora não essencial, existe um terceiro sinal resultante da secreção de citocinas e quimiocinas que influencia o fenótipo das células T (RHODES e GREEN, 2018).



**Figura 1-** Ativação de células T por DCs através de três sinais. Representação dos recetores co-inibitórios PD-1 e CTLA-4. (WANG, C. *et al.*, 2017).

#### 1.4- Células Apresentadoras de Antígenos (APCs)

A ativação do sistema imunitário exige um sistema dinâmico de regulação de sinais (COGDILL *et al.*, 2017).

A resposta imune celular contra o tumor envolve diversas interações entre células T, células tumorais e APCs (ver Anexo 1) (COGDILL *et al.*, 2017). A elevada eficácia de processamento de antígenos, a apresentação constitutiva de moléculas de MHC II e a presença de recetores co-estimulatórios faz das células B, macrófagos e DCs APCs profissionais (AROSA *et al.*, 2012).

As DCs apresentam uma função única de apresentação cruzada (NUNES-HASLER *et al.*, 2017). Esta consiste na apresentação de antígenos exógenos por moléculas de MHC I para



ativar células TCD8<sup>+</sup> contribuindo para a imunidade específica contra células tumorais (NUNES-HASLER *et al.*, 2017). São geradas potentes respostas, mas as vias de sinalização que regulam esta apresentação ainda não são claras (NUNES-HASLER *et al.*, 2017).

Nos tecidos periféricos, as DCs imaturas possuem grande capacidade de endocitose e são especializadas na captura e processamento de antígenos, apesar da baixa expressão de moléculas MHC II (ABBAS *et al.*, 2016; NUNES-HASLER *et al.*, 2017). Da sua ativação resulta uma *upregulation* de moléculas de adesão, moléculas co-estimulatórias (CD54, B7-1 e B7-2) e moléculas MHC I e MHC II, essenciais para uma ótima resposta imune (NUNES-HASLER *et al.*, 2017). A maturação é induzida por PAMPs, citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-1, IL-6 e IFN- $\alpha$ , bem como por proteínas de choque térmico (NUNES-HASLER *et al.*, 2017).

## 2- Sistema Imunitário e o Cancro

SIEGEL *et al.* (2017) refere que “o cancro é o maior problema de saúde pública no mundo e a segunda causa de morte nos Estados Unidos”. Pode ser definido como uma doença genética complexa que afeta vários tecidos de diferentes formas e envolve o crescimento de células tumorais (CHEN, 2013; GOUBRAN, 2014; GRIMALDI *et al.*, 2017). Quanto maior a diversidade genética das células tumorais, maior é a probabilidade de serem reconhecidas como estranhas pelo sistema imunitário (GRIMALDI *et al.*, 2017). Estas células são definidas como malignas e desempenham um papel crucial no crescimento e disseminação do tumor, uma vez que fazem parte da composição celular do microambiente tumoral (TME) (GOUBRAN, 2014; GRIMALDI *et al.*, 2017).

O TME é constituído por uma componente celular e uma componente não celular. Na componente celular destacam-se três grupos: células tumorais, células imunitárias que se infiltram no tumor e células do estroma (GOUBRAN *et al.*, 2014; NELSON *et al.*, 2014; VALKENBURG *et al.*, 2018). As DCs, monócitos, linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) como células TCD8<sup>+</sup>, células TCD4<sup>+</sup> e células T reguladoras (Tregs), células NK e células supressoras de origem mielóide (MDSCs) fazem parte das células imunitárias que se infiltram no tumor (GOUBRAN *et al.*, 2014; NELSON *et al.*, 2014; VALKENBURG *et al.*, 2018). O estroma constitui o tecido de sustentação das células tumorais e desempenha um papel crucial na progressão do tumor (VALKENBURG *et al.*, 2018). Este tecido de sustentação é formado por fibroblastos, matriz extracelular (ECM), osteoblastos, condrócitos e células mesenquimais do estroma (MSC) (NELSON *et al.*, 2014; VALKENBURG *et al.*, 2018). Segundo VALKENBURG

*et al.* (2018) o estroma pode ainda apresentar outras células, como células endoteliais, pericitos, adipócitos, macrófagos imunossupressores associados ao tumor (TAMs) e outras células do sistema imunitário.

Hoje, o TME é amplamente discutido uma vez que influencia a progressão do cancro e os resultados da terapêutica (VALKENBURG *et al.*, 2018). Este novo paradigma foi capaz de revogar o conceito simplista de que o cancro é apenas um conjunto de células com crescimento descontrolado (COGDILL *et al.*, 2017; VALKENBURG *et al.*, 2018).

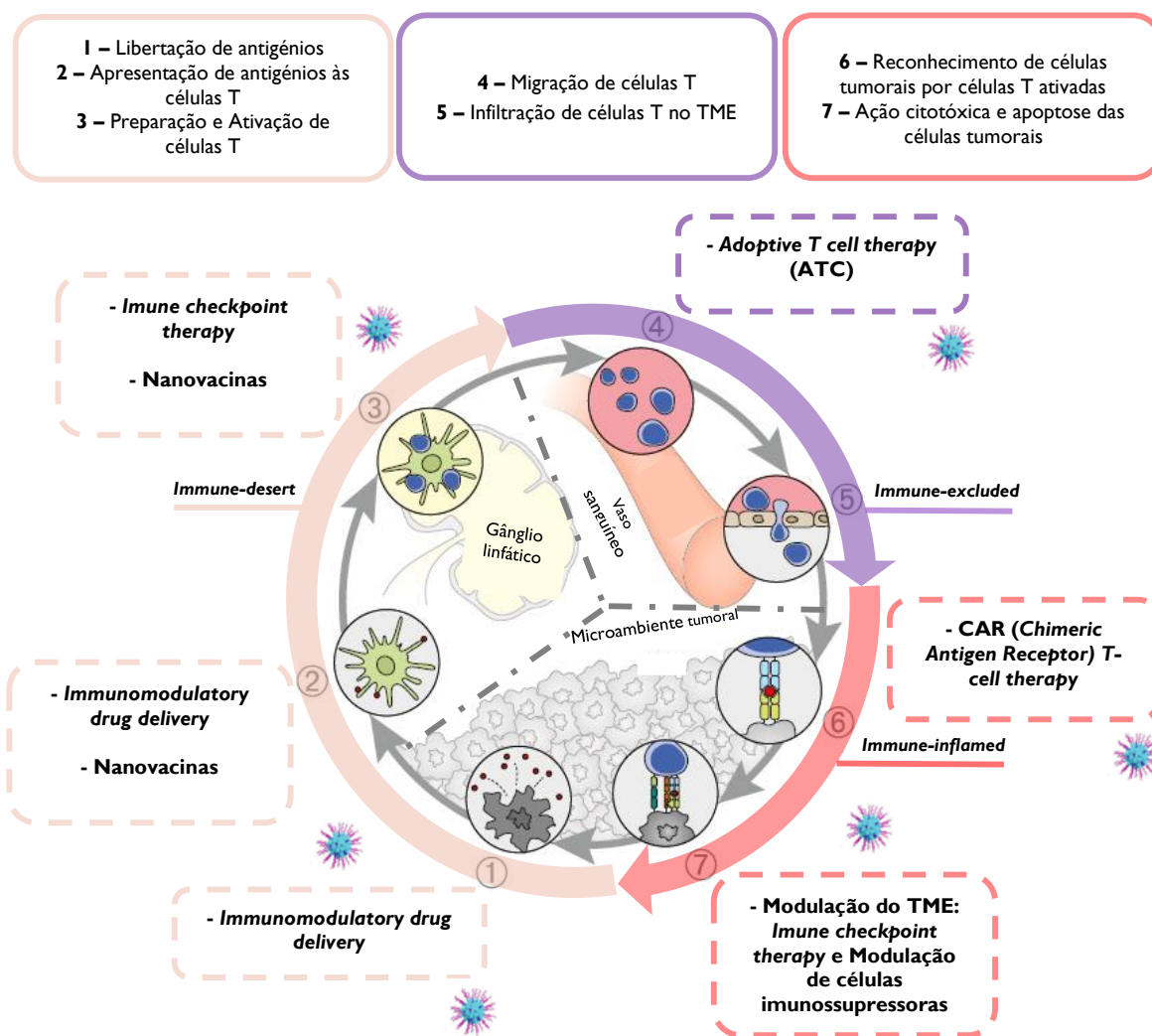
O sistema imunitário é capaz de inibir ou promover o crescimento tumoral e, perante esta função paradoxal foi desenvolvido um *tumor immuno-editing model* constituído por três fases: Fase de eliminação - eliminação de células tumorais; Fase de equilíbrio - sobrevivência de algumas células tumorais e evolução do cancro; Fase de escape - escape das células tumorais ao sistema imunitário e proliferação do cancro (VAN DER BURG *et al.*, 2016; KAPADIA *et al.*, 2015; ZANG *et al.*, 2017). A fase de eliminação, resposta imune efetiva, é descrita pelo ciclo da imunidade contra o cancro (CHEN, 2013; GRIMALDI *et al.*, 2017).

## 2.1- Ciclo da Imunidade Contra o Cancro

A vigilância imunológica, processo de reconhecimento e eliminação das células tumorais, envolve sete etapas principais, constituindo um ciclo, no qual o sistema imunitário é capaz de “combater” o cancro, Figura 2 (CHEN, 2013; MAHONEY *et al.*, 2015).

Na etapa 1 da Figura 2, de acordo com vários estudos, as células tumorais que são destruídas libertam antígenos tumorais. A caracterização molecular e bioquímica dos antígenos tumorais permitiu a sua classificação em dois grupos: os antígenos associados ao tumor (TAAs) que são expressos pelas células tumorais, mas com expressão limitada nas células normais e os antígenos tumorais específicos, somente expressos em células tumorais, por exemplo os neoantígenos (BUTTERFIELD, 2015; FINN, 2018; HU, Z. *et al.*, 2018). Os antígenos tumorais são posteriormente processados por APCs, as DCs (CHEN, 2013; JO *et al.*, 2017; MAHONEY *et al.*, 2015).

Nos gânglios linfáticos, etapa 2, ocorre a apresentação dos antígenos tumorais às células TCD8<sup>+</sup> e TCD4<sup>+</sup> por DCs ativadas via moléculas de MHC I e MHC II, respetivamente, seguida de diferenciação de células T *naive* em células T efetoras contra os antígenos específicos do tumor, etapa 3 (CHEN, 2013; GRIMALDI *et al.*, 2017). As três etapas descritas anteriormente, resumem a iniciação e propagação da resposta imune.



**Figura 2-** Ciclo da imunidade contra o cancro e respetivas estratégias de nanoimunoterapia. Representação dos três fenótipos imunológicos. (Adaptado de CHEN, 2013; CHEN e MELLMAN, 2017; GRACIOTTI *et al.*, 2017; JO *et al.*, 2017; KAPADIA *et al.*, 2015; QIU *et al.*, 2017).

Após diferenciação, as células T migram até ao tumor - etapa 4 - e infiltram-se no TME - etapa 5 (CHEN, 2013). Seguidamente, etapa 6, as células TCD8<sup>+</sup> efetoras reconhecem células tumorais com antígenos tumorais e ligam-se a estas através da interação TCR:MHC I (CHEN, 2013; ZANG *et al.*, 2017).

Na última etapa, a presença de citocinas inflamatórias como a IL-2 e o interferão-gama (IFN- $\gamma$ ) promovem uma resposta mediada por células TCD8<sup>+</sup> com a libertação de enzimas líticas, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  com capacidade de promover a apoptose das células tumorais (COGDILL *et al.*, 2017). O IFN- $\gamma$  é também produzido por células Th1 ativadas e células NK e desempenha um papel fundamental na imunidade antitumoral (KAPADIA *et al.*, 2015; MAHONEY *et al.*, 2015). Assim, ocorre a apoptose/necrose das células tumorais e pode ocorrer a libertação de mais antígenos, dando continuidade ao ciclo (CHEN, 2013; GRIMALDI *et al.*, 2017).

Na prática, este ciclo não apresenta um desempenho ideal, pois cada etapa é regulada por uma perfeita coordenação de fatores estimulatórios, que potenciam a imunidade, e inibitórios que a reduzem (CHEN e MELLMAN, 2017; ZANG *et al.*, 2017).

## 2.2- Mecanismos que Inibem o Sistema Imunitário

Tendo em conta os mecanismos que inibem a imunidade antitumoral, CHEN e MELLMAN, (2017) identificaram em vários estudos, três fenótipos imunológicos, representados na Figura 2, de acordo com a presença de células do sistema imunitário, nomeadamente células T. Esta classificação veio complementar o conceito de fenótipo inflamado e não inflamado, anteriormente descritos por Spranger e Gajewski (CHEN e MELLMAN, 2017; COGDILL *et al.*, 2017).

O primeiro (Figura 2 - etapas 1 a 3), é designado por ***immune-desert*** caracterizado por falta de imunidade antitumoral. O TME não se encontra inflamado e existe um défice de células TCD8<sup>+</sup>, onde estas não foram expostas a antígenos ou por tolerância ativa (CHEN e MELLMAN, 2017; VAN DER WOUDE *et al.*, 2017). Este fenótipo sugere que não existe imunidade antitumoral, sendo necessário uma ativação específica de células T (CHEN, 2013; CHEN e MELLMAN, 2017).

O segundo (Figura 2 - etapas 4 e 5), é designado por ***immune-excluded***, que após iniciação e propagação das células T nas etapas 1 a 3, estas ficam em grande quantidade no estroma, tornando a resposta antitumoral ineficaz (CHEN e MELLMAN, 2017; VAN DER WOUDE *et al.*, 2017). Finalizando, o terceiro (Figura 2 - etapas 6 e 7) é designado por ***immune-inflamed*** e apresenta inúmeras células TCD4<sup>+</sup> e células TCD8<sup>+</sup>, mas a resposta imunitária é atenuada pelo aumento de células imunossupressoras (CHEN e MELLMAN, 2017; VAN DER WOUDE *et al.*, 2017).

Durante muitas décadas, o papel do sistema imunitário foi pouco valorizado porque o tumor desenvolve vários mecanismos de escape, subjacentes a cada fenótipo (CHEN e MELLMAN 2017; COGDILL *et al.*, 2017; VALKENBURG *et al.*, 2018).

Na etapa 1, pode existir uma *downregulation* de TAAs que culmina numa menor capacidade imunogénica (CHEN e MELLMAN, 2017). Na progressão do tumor, etapas 3 e 7, os ***immune checkpoints*** - “pontos de controlo” - regulam a imunidade adaptativa (CHEN e MELLMAN, 2017; COGDILL *et al.*, 2017; MAHONEY *et al.*, 2015). O aumento da expressão dos *immune checkpoints* está associada a uma diminuição da capacidade e perda de função das células T sobre as células tumorais - regulação negativa (MAHONEY *et al.*, 2015; TUNGER *et al.*, 2018). Os recetores *immune checkpoints* com maior interesse terapêutico em ensaios clínicos são a

proteína de morte celular programada 1 (PD-1- *Programmed Cell Death Protein 1*) e o antígeno 4 do linfócito T citotóxico (CTLA-4- *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*) (CHEN e MELLMAN, 2017; GONG *et al.*, 2018; TUNGER *et al.*, 2018).

Após ativação das células T, etapa 3, o **recetor co-inibitório PD-1** é expresso (CHEN, 2013; GONG *et al.*, 2018; ZANG *et al.*, 2017). “O PD-1 é ainda expresso em células B, macrófagos, Tregs e células NK, após a sua ativação” (GONG *et al.*, 2018). Este recetor interage com o ligando do recetor de morte celular programada 1 ou 2 (PD-L1- *programmed cell death 1 ligand* ou PD-L2- *programmed cell death 2 ligand*) (TUNGER *et al.*, 2018).

No TME, etapa 7, a libertação de IFN- $\gamma$  pelas células T ativadas induz a expressão de PD-L1 em células do sistema imunitário que se infiltram no tumor e em células tumorais (CHEN e MELLMAN, 2017; GOUBRAN *et al.*, 2014; HONG e DOBROVOLSKAIA, 2018). As DCs do TME que expressam ou sobre-expressam o PD-L1, migram para os gânglios linfáticos e o PD-L1 liga-se ao recetor B7-1 e PD-1 das células T, inibindo a sua ativação e subsequente inibição da propagação do ciclo da imunidade contra o cancro, Anexo II - (A) (CHEN e MELLMAN, 2017; GOUBRAN *et al.*, 2014; HONG e DOBROVOLSKAIA, 2018). O PD-L1, expresso pela maioria dos tumores malignos, pode ainda inibir as últimas etapas do ciclo da imunidade contra o cancro ao estabelecer a ligação com os recetores PD-1 e B7-1 das células T (GONG *et al.*, 2018). Esta sinalização inibe a atividade efetora das células T no TME e fortalece a resistência do tumor devido à perda de citotoxicidade e diminuição da produção de citocinas, Anexo II - (B) (GONG *et al.*, 2018; HONG e DOBROVOLSKAIA, 2018; MAHONEY *et al.*, 2015; VAN DER BURG *et al.*, 2016).

O segundo **recetor co-inibitório CTLA-4**, expresso em células T ativadas, compete com o CD28 na ligação aos recetores B7-1 ou B7-2 das DCs, Figura 1. O CTLA-4 apresenta maior afinidade para o B7-1 ou B7-2 e desta interação resulta uma inibição da proliferação das células T e diminuição da produção de citocinas numa fase inicial, etapa 3 do ciclo da imunidade contra o cancro (CHEN, 2013; CHEN e MELLMAN, 2017; HONG e DOBROVOLSKAIA, 2018; TUNGER *et al.*, 2018). A ausência de CTLA-4 em células T e o bloqueio da interação CTLA-4:B7-1 ou CTLA-4:B7-2 favorece a imunidade antitumoral (TUNGER *et al.*, 2018).

As células tumorais desenvolvem inúmeros mecanismos que interferem com a maquinaria de apresentação e processamento de antígeno, nomeadamente perda total ou *downregulation* de MHC I que evita o reconhecimento pelas células TCD8<sup>+</sup> na etapa 6 (HONG e DOBROVOLSKAIA, 2018; KAPADIA *et al.*, 2015).

Durante a angiogénese tumoral, processo de formação de novos vasos a partir dos vasos pré-existentes, é produzido o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), etapa 5 (CHEN e MELLMAN, 2017; HONG e DOBROVOLSKAIA, 2018). Este regula positivamente a

angiogénese, além de induzir *upregulation* do recetor PD-L1 nas DCs (HONG e DOBROVOLSKAIA, 2018).

Atualmente é evidente que a desregulação do TME interfere com a progressão do tumor, mas ainda pouco se conhece sobre a forma como este determina as características das células tumorais (COGDILL *et al.*, 2017; TAKAHASHI e EHATA, 2018). A imunidade antitumoral ainda pode ser suprimida, no TME, por células imunossupressoras (TAMs, MDSCs e células Tregs) (KAPADIA *et al.*, 2015; ZANG *et al.*, 2017).

No Anexo III encontram-se resumidos os mecanismos de escape ao sistema imunitário associados a cada etapa do ciclo da imunidade contra o cancro.

### **2.2.1- Macrófagos Imunossupressores Associados ao Tumor (TAMs)**

Os macrófagos são células mielóides que fazem parte do TME original ou são recrutados a partir da medula óssea (GOUBRAN *et al.*, 2014; ZANG *et al.*, 2017). Na progressão do tumor, a produção de citocinas e quimiocinas permite o recrutamento de monócitos com posterior diferenciação em macrófagos, o que lhes permite adquirir a designação de TAMs (GOUBRAN *et al.*, 2014; KAPADIA *et al.*, 2015; ZANG *et al.*, 2017).

Os TAMs diferenciam-se em tipo M1 (classicamente ativados), com capacidade anticancerígena e em tipo M2 (alternativamente ativados), com papel pró-tumoral (ABBAS *et al.*, 2016; KAPADIA *et al.*, 2015).

Nos tumores predominam os macrófagos do tipo M2 como resultado da produção de IL-6 e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) pelas células tumorais (VAN DER BURG *et al.*, 2016). Estes macrófagos contribuem para o ambiente imunossupressor e podem expressar o recetor B7-1 que se liga ao recetor inibidor CTLA-4 das células TCD8<sup>+</sup>, inibindo a sua função, como também podem expressar o ligando PD-L1, desencadeando uma diminuição da proliferação das células T (VAN DER BURG *et al.*, 2016; ZANG *et al.*, 2017).

De acordo com KAPADIA *et al.* (2015) e VAN DER BURG *et al.* (2016), a presença de TAMs do tipo M2 está normalmente associada a resultados clínicos negativos.

### **2.2.2- Células Supressoras de Origem Mielóide (MDSCs)**

São células imaturas derivadas da linhagem mielóide e apresentam uma robusta atividade imunossupressora (GOUBRAN *et al.*, 2014; ZANG *et al.*, 2017).

As MDSCs têm a capacidade de inibir a atividade das APCs, promover a diferenciação de macrófagos do tipo M2 e ativar as células Tregs (GOUBRAN *et al.*, 2014). A IL-10 e o fator

de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) são as principais citocinas produzidas pelas MDSCs, TAMs, Tregs e células tumorais (GOUBRAN *et al.*, 2014; ZANG *et al.*, 2017). Tal como os TAMs, a presença de MDSCs desencadeia resultados clínicos negativos em alguns cânceros como o pancreático, o esofágico e o gástrico (KAPADIA *et al.*, 2015).

### **2.2.3- Células T Reguladoras (Tregs)**

As Tregs controlam a resposta imunológica e limitam a ativação do sistema imunitário (KAPADIA *et al.*, 2015; ZANG *et al.*, 2017). Além da secreção de citocinas, na sua superfície existem vários recetores com atividade imunossupressora como o PD-1, recetor do fator de crescimento vascular endotelial (VEGFR) e CTLA-4 (HONG e DOBROVOLSKAIA, 2018; MAHONE *et al.*, 2015; ZANG *et al.*, 2017). A ligação CTLA-4:B7 induz a produção de indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) que cataboliza o componente essencial para a sua proliferação, o triptofano (HONG e DOBROVOLSKAIA, 2018). Em várias neoplasias malignas os resultados clínicos são negativos quando existe recrutamento e posterior infiltração de Tregs no TME (KAPADIA *et al.*, 2015; ZANG *et al.*, 2017).

### 3- Nanoimunoterapia

#### 3.1- Introdução

A quimioterapia, radioterapia e cirurgia são abordagens terapêuticas no tratamento do cancro com baixa eficácia (ESTANQUEIRO *et al.*, 2015).

A imunoterapia é uma forma de tratamento promissora, que inverteu a partir dos anos noventa a história do tratamento do cancro (GRIMALDI *et al.*, 2017; HONG e DOBROVOLSKAIA, 2018). A imunoterapia tem por base estimular ou modular o sistema imunitário para que este fique apto a combater o tumor, permitindo-lhe desenvolver a “própria” memória imunológica que o protege de eventuais recidivas (GRIMALDI *et al.*, 2017; HONG e DOBROVOLSKAIA, 2018; SAU *et al.*, 2018). Assim, surge como um potencial tratamento de primeira linha e não apenas como um tratamento de recurso (ROCHE, 2017). Contudo, apresenta algumas limitações que podem ser ultrapassadas com nanosistemas, uma nova abordagem de tratamento: a nanoimunoterapia (JO *et al.*, 2017; SAU *et al.*, 2018; ZANG *et al.*, 2017).

#### 3.2- Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma área atrativa para o tratamento e diagnóstico de cancro (ESTANQUEIRO *et al.*, 2015; TRAN *et al.*, 2018).

As nanopartículas são partículas coloidais cujo sucesso depende da elevada capacidade de carga, natureza do material biocompatível e/ou biodegradável, mecanismo de libertação controlada do fármaco a um determinado alvo e ausência de libertação prematura do fármaco (ESTANQUEIRO *et al.*, 2015).

Os nanosistemas com maior interesse em ensaios clínicos são lipossomas, nanoesferas, nanocápsulas, micelas poliméricas, dendrímeros, nanopartículas de ouro (AuNPs), nanotubos de carbono (CNTs), nanopartículas mesoporosas de sílica (MSNPs) e nanopartículas magnéticas (MNPs) (EL-BOUBBOU, 2018; GRACIOTTI *et al.*, 2017; HU, X. *et al.*, 2017; QIU *et al.*, 2017; RICHARDS *et al.*, 2017). O Anexo IV esquematiza a classificação e características das nanopartículas, posteriormente abordadas na presente monografia.

São inúmeros os estudos que se debruçam na tecnologia de fabrico e conceção das nanopartículas, de forma a controlar parâmetros críticos: natureza do núcleo e da superfície, tamanho e forma (JO *et al.*, 2017; SANGTANI *et al.*, 2017; SAU *et al.*, 2018; TRAN *et al.*, 2018).

As nanopartículas são pequenas, convencionalmente com diâmetro de 1 nanómetro (nm) a 100 nm, de acordo com o *National Nanotechnology Initiative* (JO *et al.*, 2017; SANGTANI *et al.*, 2017).



A modificação da superfície é o principal parâmetro que afeta o tempo de circulação, direcionamento e toxicidade (JO *et al.*, 2017; SHAO *et al.*, 2015). Foi relatado que nanopartículas com carga positiva interagem com proteínas do soro, formando aglomerados que são facilmente eliminados pelo Sistema Reticuloendotelial (SRE) (JO *et al.*, 2017). Contudo, nanopartículas poliméricas *zwitterionic* (carga global neutra) após atingirem o TME ácido, adquirem carga positiva facilitando a internalização pelas células tumorais (JO *et al.*, 2017). Esta internalização pode ainda ser facilitada com a funcionalização da superfície das nanopartículas, que se traduz na adição de grupos funcionais cujos alvos são os recetores específicos das células tumorais (JO *et al.*, 2017). Com o objetivo de aumentar o tempo de circulação e diminuir o reconhecimento e posterior eliminação pelo SRE, a superfície das nanopartículas pode ser funcionalizada com poli(etileno glicol) (PEG) (JO *et al.*, 2017; MINTZER e SIMANEK, 2009). O PEG atrai moléculas de água, pela sua natureza hidrofílica, para o redor da nanopartícula evitando a ação das opsoninas, com posterior diminuição da captação e eliminação pelo SRE (JO *et al.*, 2017; QIAO *et al.*, 2018). Contudo, estudos recentes indicam que a presença de PEG causa efeitos colaterais como danos no DNA e ativação do sistema complemento desencadeando reações de hipersensibilidade (QUACH *et al.*, 2018).

### 3.3- Estratégias de Nanoimunoterapia

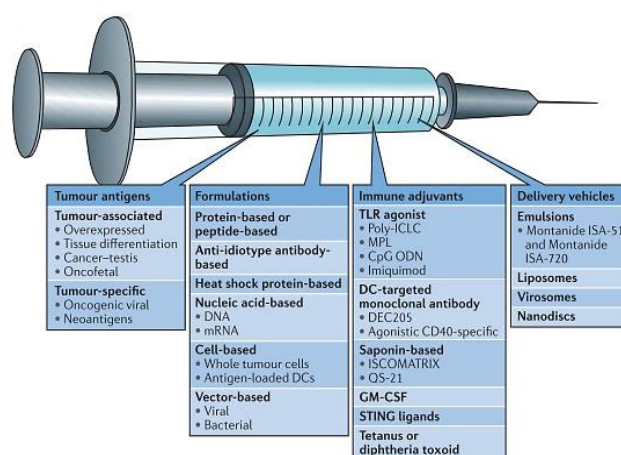
As principais estratégias desenvolvidas ao longo de vários anos, de forma a utilizar o sistema imunitário para combater o tumor, seguindo a Figura 2 no sentido retrógrado dos ponteiros do relógio a partir da etapa I são: (I) Nanopartículas para entrega de fármacos (*drug delivery*) imunomoduladores e/ou citocinas, (II) Nanovacinas para entrega de antígenos (TAAs), adjuvantes e/ou ligandos para APCs, (III) *Immune checkpoint therapy*, (IV) *Adoptive T cell therapy* (ATC) usando nanopartículas com fatores estimulatórios e nanopartículas como células apresentadoras de antígenos artificiais (aAPCs - *artificial Antigen Presenting Cells*) para ativação e expansão de células T, (V) CAR (*Chimeric Antigen Receptor*) *T-cell therapy* usando nanopartículas que melhoram esta terapia, (VI) Modulação do TME através de *immune checkpoint therapy* e modulação de células imunossupressoras com nanopartículas (CHEN, 2013; GRACIOTTI *et al.*, 2017; HU, X. *et al.*, 2017; KAPADIA *et al.*, 2015; QIU *et al.*, 2017; TUNGER *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2017).

Portanto, as nanopartículas melhoram a apresentação de antígenos às células T com posterior ativação das mesmas, modulam o TME de forma a estimular a resposta imune e aumentam a morte de células tumorais/libertação de antígenos (TRAN *et al.*, 2018).

Nesta monografia serão abordadas algumas das estratégias da Figura 2.

### 3.3.1- Nanovacinas: entrega de antígenos, adjuvantes e/ou ligandos para APCs

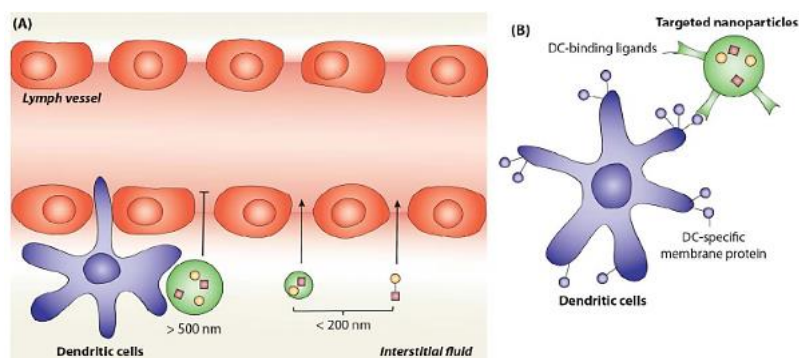
A vacinação é um processo de imunização ativa cujo objetivo é induzir imunidade “artificial” com ativação de células TCD8<sup>+</sup> (WANG, Z. *et al.*, 2018). Uma vacina contra o cancro induz imunidade endógena e pode ajudar a eliminar o tumor já existente, vacina terapêutica, ou prevenir o seu desenvolvimento, vacina profilática (BUTTERFIELD, 2015; HU, Z. *et al.*, 2018; WANG, Z. *et al.*, 2018). Fruto da constante investigação sobre esta temática, muitas vacinas foram desenvolvidas: vacinas de subunidades baseadas em péptidos ou proteínas, vacinas de ácidos nucleicos, vacinas baseadas em células, vacinas de vetores modificados, entre outras (HU, Z. *et al.*, 2018). Muitas delas apresentam benefícios clínicos limitados devido à entrega ineficiente da vacina (SCHMID *et al.*, 2017).



**Figura 3-** Componentes principais de uma nanovacina: antígenos tumorais, formulação, adjuvantes e veículos de entrega. (HU, Z. *et al.*, 2018).

Uma nanovacina é uma vacina que compreende quatro componentes principais, Figura 3.

As nanovacinas de subunidades, especialmente as baseadas em nanoveículos inovadores, são uma abordagem cativante onde os antígenos tumorais são entregues *in vivo* às DCs, mas estas nanovacinas dependem de DCs endógenas do doente (HU, X. *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2017). Como APCs, as DCs são um alvo atraente para o direcionamento passivo (Figura 4 - (A)) e ativo (Figura 4 - (B)), ultrapassando as limitações da estratégia de vacinação *ex-vivo* baseada em DCs (GRACIOTTI *et al.*, 2017; HU, X. *et al.*, 2017; KAPADIA *et al.*, 2015; TRAN *et al.*, 2018). No direcionamento ativo, ao contrário do passivo, as nanopartículas apresentam moléculas sinalizadoras na sua superfície que possuem elevada afinidade para proteínas específicas da superfície das DCs (TRAN *et al.*, 2018).



**Figura 4-** Direcionamento passivo (A) e ativo (B) de nanovacinas para as DCs. (TRAN *et al.*, 2018).

Determinados estudos suportam que nanopartículas com diâmetro menor do que 200 nm são capazes de atingir as DCs residentes nos gânglios linfáticos, em detrimento das nanopartículas com diâmetro maior do que 500 nm, que são incorporadas pelas DCs com posterior migração para os gânglios linfáticos, Figura 4 - (A) (TRAN *et al.*, 2018). No entanto, o direcionamento ótimo para os gânglios linfáticos é conseguido com nanopartículas de diâmetro menor do que 50 nm (JIANG *et al.*, 2017; TRAN *et al.*, 2018).

A caracterização e identificação do antígeno tumoral é um fator importante em qualquer nanovacina (GRACIOTTI *et al.*, 2017). A nanovacinação pode ser baseada na administração e direcionamento de epítopos de TAAs (péptidos), com estrutura terciária, compartilhados pela maioria dos doentes, com particular destaque aos que são sobre-expressos, por exemplo o recetor do fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2 (HER2) (GRACIOTTI *et al.*, 2017).

A estrutura terciária de epítopos de TAAs previne a sua degradação pela exopeptidase, no entanto apresentam baixa imunogenicidade, pelo que necessitam de ser administrados com adjuvantes (BUTTERFIELD, 2015; FONTANA *et al.*, 2017; HU, Z. *et al.*, 2018; KAPADIA *et al.*, 2015). Os adjuvantes são “substâncias que podem ser adicionadas às vacinas para aumentar a imunogenicidade de um antígeno” (VAN DER BURG *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2017). O CpG-DNA, oligonucleótido de DNA, é um adjuvante essencial na ativação das DCs por meio da ligação ao *Toll-like Receptor 9* (TLR-9) no lúmen do endossoma (QIU *et al.*, 2017; ZANG *et al.*, 2017).

Contudo, os antígenos específicos do tumor, também específicos de cada doente, como os neoantígenos e antígenos de vírus oncogênicos têm despertado interesse (SAU *et al.*, 2018; VAN DER BURG *et al.*, 2016). Ao serem reconhecidos pelo sistema imunitário como “estranhos” e, portanto, altamente imunogênicos e não sujeitos a tolerância central, são capazes de induzir uma resposta específica mediada por células TCD8<sup>+</sup> (HU, Z. *et al.*, 2018; SAU *et al.*, 2018; VAN DER BURG *et al.*, 2016). Evidências sustentam que a vacinação com

neoantígenos em modelos animais de sarcoma e melanoma desencadeou uma boa resposta mediada por células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>, induzindo atividade antitumoral (HU, Z. *et al.*, 2018). Esta área encontra-se em desenvolvimento, mas devido à heterogeneidade genética, resultante de milhares de mutações somáticas, a vacinação com antígenos específicos do tumor terá de ser personalizada para cada doente (HU, Z. *et al.*, 2018).

As nanovacinas, ao serem constituídas por nanoveículos, apresentam aplicações diversas como a proteção da degradação proteolítica do antígeno, interação com o sistema imune inato e adaptativo, realização da co-libertação de antígenos e uma variedade de adjuvantes conferindo eficiência na apresentação cruzada às DCs, podem agir como adjuvantes, entre outras aplicações (HU, X. *et al.*, 2017; JO *et al.*, 2017; LUO *et al.*, 2017; QIU *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2017).

São vários os nanoveículos utilizados em nanovacinas, incluindo lipossomas, nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), micelas poliméricas, dendrímeros, AuNPs e CNTs.

### 3.3.1.1- Lipossomas

Os lipossomas convencionais são constituídos por fosfolípidos e colesterol e apresentam-se como fortes candidatos em estratégias de vacinação (YOSHIZAKI *et al.*, 2017; ZANG *et al.*, 2017).

Um dos sucessos é a nanovacina *DPX-Survivac*, vacina de subunidade baseada em péptidos, aprovada pela Agência Europeia do Medicamento (EMA) como medicamento órfão (IMV INC., 2018). É um lipossoma com 120 nm (captado por DCs nos gânglios linfáticos) composto por um rácio lipídico de 10:1 de fosfatidilcolina:colesterol (KARKADA *et al.*, 2014; SAU *et al.*, 2018). A formulação resulta da mistura de um TAA a survivina, um epítipo derivado de toxoide tetânico, montanide ISA 51 e um adjuvante (exemplo: agonista de TLR-9) (GRIPPIN *et al.*, 2017; KARKADA *et al.*, 2014; SAU *et al.*, 2018). A survivina, proteína anti-apoptótica reguladora da mitose celular, é associada à falência terapêutica antitumoral e é expressa em mais de vinte tipos de tumores sólidos e hematológicos (GRIPPIN *et al.*, 2017; IMV INC., 2018). Ensaios clínicos de fase II mostraram, em doentes com cancro de ovário avançado, que três doses de *DPX-Survivac* aumentam os níveis de células T citotóxicas específicas para o tumor, vinte e um dias após a primeira vacina, como também foi verificado um aumento da produção de citocinas e células Th (GRIPPIN *et al.*, 2017; IMV INC., 2018).

*DPX-0907* está a ser estudada em ensaios clínicos de fase I de cancro da mama, ovário e próstata (SAU *et al.*, 2018). A composição é igual à *DPX-Survivac*, mas esta é constituída por

sete epítopos hidrofílicos de TAAs, isolados, separados e purificados de linhas celulares e apresentados via MHC I (SAU *et al.*, 2018).

“Nestas plataformas os antígenos podem ser encapsulados no núcleo interno aquoso, adsorvidos na bicamada lipídica, quer na região hidrofílica, quer na hidrofóbica ou conjugados à superfície da vesícula” (HUME e LUA, 2017). Estudos revelam que a entrega de vários TAAs, em vez de um único, melhora o direcionamento para DCs *in vivo* e *in vitro* (FONTANA *et al.*, 2017; KAPADIA *et al.*, 2015).

As modificações de superfície trazem aos lipossomas diversas vantagens.

Os lipossomas sensíveis ao pH são bons candidatos a nanovacinas, pelo facto de realizarem a entrega do antígeno no citoplasma por destabilização ou fusão com a membrana endossomal/lisossomal (YOSHIZAKI *et al.*, 2017; ZANG *et al.*, 2017).

Um projeto de uma nanovacina *in vivo* com lipossomas de 100 nm, modificados à superfície com o polímero *3-methylglutarylated hyperbranched poly(glycidol)* (MGlu-HPG), sensível ao pH, permite a entrega intracelular eficaz de antígenos às DCs (ZANG *et al.*, 2017). Após maturação nos endossomas precoces das DCs é nos endossomas com pH ácido que ocorre a protonação das cadeias poliméricas do MGlu-HPG com mudança das suas propriedades hidrofílicas para hidrofóbicas, culminando num comportamento fusogénico que resulta na desintegração da membrana lipídica e libertação do antígeno no citosol (HU, X. *et al.*, 2017; YOSHIZAKI *et al.*, 2017). Os péptidos do antígeno modelo ovalbumina-I (OVA-I) e ovalbumina-II (OVA-II), específicos para MHC I e MHC II de DCs, respetivamente, são encapsulados no espaço interno aquoso do lipossoma (ZANG *et al.*, 2017). Estes lipossomas além de sensíveis ao pH, são constituídos por um lipídico catiónico (TRX- 3,5-*didodecyloxybenzamidine*) que estabelece interações eletrostáticas, por diferentes métodos de complexação, com o adjuvante aniónico (CpG-DNA), também presente na superfície do lipossomas, ver Anexo V - (A) (ZANG *et al.*, 2017). Os resultados mostram que o lipossoma funcionalizado simultaneamente com TRX e CpG-DNA (*Post-mix*) exerce um maior efeito antitumoral em relação ao lipossoma apenas com MGlu-HPG (*Pre-mix*) (YOSHIZAKI *et al.*, 2017).

Em murganhos fêmea C57BL/6 com *Post-mix* verificou-se um aumento de citocinas, *upregulation* de moléculas co-estimulatórias nas DCs, permitindo a ativação de uma resposta TCD8<sup>+</sup> específica *in vivo* e diminuição do volume do tumor (YOSHIZAKI *et al.*, 2017).

### 3.3.1.2- Nanopartículas de Ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA)

As nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais, por sua vez, constituídos por diversos polímeros sintéticos como o PLGA de forma a ativar o sistema imunitário (ZANG *et al.*, 2017). O PLGA é um polímero biocompatível e biodegradável amplamente utilizado em nanovacinas por apresentar características imunoestimulantes (FONTANA *et al.*, 2017; GRACIOTTI *et al.*, 2017).

Ao contrário dos adjuvantes, os antígenos não possuem nenhum receptor na superfície da APC que possa facilitar a sua entrega intracelular (ZHU *et al.*, 2017). No entanto, os antígenos geralmente precisam de ser internalizados por APCs para posterior processamento e apresentação (ZHU *et al.*, 2017).

Neste contexto, CRUZ *et al.* (2014) e várias revisões de JO *et al.* (2017) e ZANG *et al.* (2017) mostram a importância do direcionamento ativo *in vivo*.

O antígeno (OVA) e os adjuvantes Pam3Csk4 (também conhecido por TLR2L- *Toll-like receptor 2 ligand*) e Poly (I:C) (também conhecido por TLR3L- *Toll-like receptor 3 ligand*) foram co-encapsulados em nanopartículas revestidas à superfície com o polímero hidrofílico PEG (JO *et al.*, 2017). Posteriormente estas foram funcionalizadas com anticorpos monoclonais (mAb) direcionados a receptores específicos da superfície das DCs (CD40, CD205/DEC-205 e STING), avaliando a eficácia do direcionamento na ativação das DCs e na condução de uma resposta TCD8<sup>+</sup> robusta (GRACIOTTI *et al.*, 2017; JO *et al.*, 2017; KAPADIA *et al.*, 2015).

*In vivo* a vacinação subcutânea de murganhos C57BL/6 com nanopartículas de PLGA funcionalizadas com  $\alpha$ CD40-mAb (PLGA-NP-CD40) induziu uma resposta de células TCD8<sup>+</sup> específica contra OVA, antígeno expresso no modelo de melanoma, prolongando a sobrevivência dos animais (JO *et al.*, 2017). Assim, PLGA-NP-CD40 fornece o antígeno às DCs *in vivo* e melhora a sua maturação, em comparação com nanopartículas sem  $\alpha$ CD40-mAb (CRUZ *et al.*, 2014; ROSALIA *et al.*, 2015).

A incorporação de vários mAb, nomeadamente três, melhora a maturação das DCs, tal como acontece com os TAAs (FONTANA *et al.*, 2017; KAPADIA *et al.*, 2015).

Outras abordagens evidenciam que a co-administração de antígenos e adjuvantes através de nanoesferas de PLGA é mais vantajosa do que a entrega de antígenos e adjuvantes isolados, com aumento de 1,5 vezes na proliferação de células T específicas para o antígeno e 2,5 vezes na produção de IFN- $\gamma$  (TRAN *et al.*, 2018).

### 3.3.1.3- Nanopartículas de Ouro (AuNPs)

AuNPs são nanopartículas inorgânicas altamente versáteis que têm atraído interesse em várias aplicações terapêuticas *in vivo* e *in vitro* (FAROOQ *et al.*, 2018). A biocompatibilidade, a capacidade de assumir diferentes formas com base nas diversas condições de síntese permitem que seja um nanoveículo amplamente estudado na entrega e direcionamento de antígenos (peptídeos) em nanovacinas (FAROOQ *et al.*, 2018; FONTANA *et al.*, 2017).

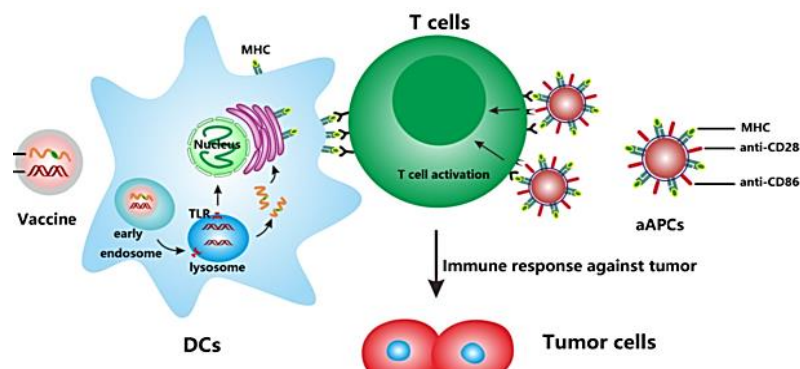
Com recurso à técnica *Layer-by-Layer* (LbL), “auto-montagem por camada-a-camada” através de interações eletrostáticas é formada uma nanoarquitetura (ZHANG *et al.*, 2015). Na superfície de AuNPs com carga positiva ocorre a deposição do adjuvante de carga oposta (Poly (I:C) carregado negativamente) e sobre este o antígeno (OVA) com carga positiva, Anexo V - (B) (FONTANA *et al.*, 2017). Esta nanoarquitetura de 40 nm foi administrada em murganhos por vacinação intradérmica e aumentou a ativação das DCs nos gânglios linfáticos, pela facilidade de internalização, induzindo respostas celulares TCD8<sup>+</sup> específicas, em comparação com o antígeno solúvel e o adjuvante (FONTANA *et al.*, 2017). Segundo ALMEIDA *et al.*, (2015) o grupo de murganhos que recebeu a nanovacina (AuNP-OVA) sem o adjuvante CpG-DNA induziu uma resposta antígeno específica semelhante ao grupo que recebeu a nanovacina com adjuvante (AuNP-OVA-CpG-DNA). Assim, estudos demonstram que nanopartículas inorgânicas podem apresentar por si só um efeito adjuvante, isto é, são um “auto-adjuvante” na entrega de TAAs em nanovacinas (HU, X. *et al.*, 2017; QIU *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2017).

### 3.3.2- Adoptive T cell Therapy (ATC): nano-aAPCs para ativação e expansão de células T

A ATC consiste no isolamento de células T do doente, expansão *ex-vivo* e (re)introdução das mesmas no doente quando são altamente específicas para os antígenos tumorais (KAPADIA *et al.*, 2015). Esta estratégia, tal como a do ponto anterior (3.3.1), tem com objetivo ativar e expandir as células T de forma combater o tumor, Figura 5 (HU, X. *et al.*, 2017).

Com o objetivo de melhorar a ATC atual, um sistema biomimético baseado em nanopartículas revela grandes progressos (HU, X. *et al.*, 2017; RHODES e GREEN, 2018).

Esta tecnologia, de fácil produção, origina APCs “artificiais” que ativam a imunidade adaptativa de forma similar ao processo natural de ativação das células T por APCs do sistema imunitário, nomeadamente DCs (GRACIOTTI *et al.*, 2017; RHODES e GREEN, 2018). As aAPCs podem ser usadas na ATC *ex-vivo* ou diretamente administradas *in vivo* por via intravenosa (IV) (WANG, C. *et al.*, 2017).



**Figura 5-** Nanovacinas e aAPCs ativam células T e promovem a eliminação de células tumorais. (Adaptado de ZANG *et al.*, 2017).

Assim, as aAPCs de tamanho nanométrico (nano-aAPCs) mimetizam as DCs biológicas, apresentando péptidos antigênicos acoplados a moléculas de MHC (pMHC) (sinal 1), moléculas co-estimulatórias que modulam a resposta das células T (sinal 2) e ainda podem estar envolvidos fatores solúveis (citocinas) (sinal 3) (JO *et al.*, 2017). Um estudo afirma que a ativação de uma célula TCD8<sup>+</sup> por uma aAPC de 300 nm a 600 nm requer 200 pMHC (HICKEY *et al.*, 2017). Por outro lado, o sinal 2 é normalmente mediado por mAb anti-CD28 e anti-CD86, Figura 5, embora possa ser usado o anti-4-1BB (anti-CD137) uma vez que estimula as células T na ausência do recetor CD28 (RHODES e GREEN, 2018).

As nano-aAPCs sintéticas apresentam a vantagem de não serem afetadas pela imunossupressão do TME, ao contrário das APCs biológicas (MANDAL *et al.*, 2015; RHODES e GREEN, 2018).

O tamanho nanométrico traduz-se numa pequena área de superfície para contactar com as células T (HICKEY *et al.*, 2017). De forma a ultrapassar esta limitação foram desenvolvidas várias estratégias como a manipulação da forma e a agregação de nanopartículas (RHODES e GREEN, 2018). Os nanossistemas usados como nano-aAPCs incluem lipossomas, nanopartículas de PLGA, MNPs e CNTs.

### 3.3.2.1- Nanopartículas de Ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA)

A morfologia das nanopartículas influencia a ativação das células T como mostram os resultados de MEYER *et al.* (2015). De forma a garantir a biocompatibilidade e a biodegradação foram sintetizadas nanopartículas de PLGA (225 nm) esféricas e elipsoidais (MEYER *et al.*, 2015). Ambas as nano-aAPCs de PLGA foram conjugadas à superfície com o complexo MHC-IgG (pMHC) e mAb anti-CD28, sinal 1 e 2, respetivamente (MEYER *et al.*, 2015).

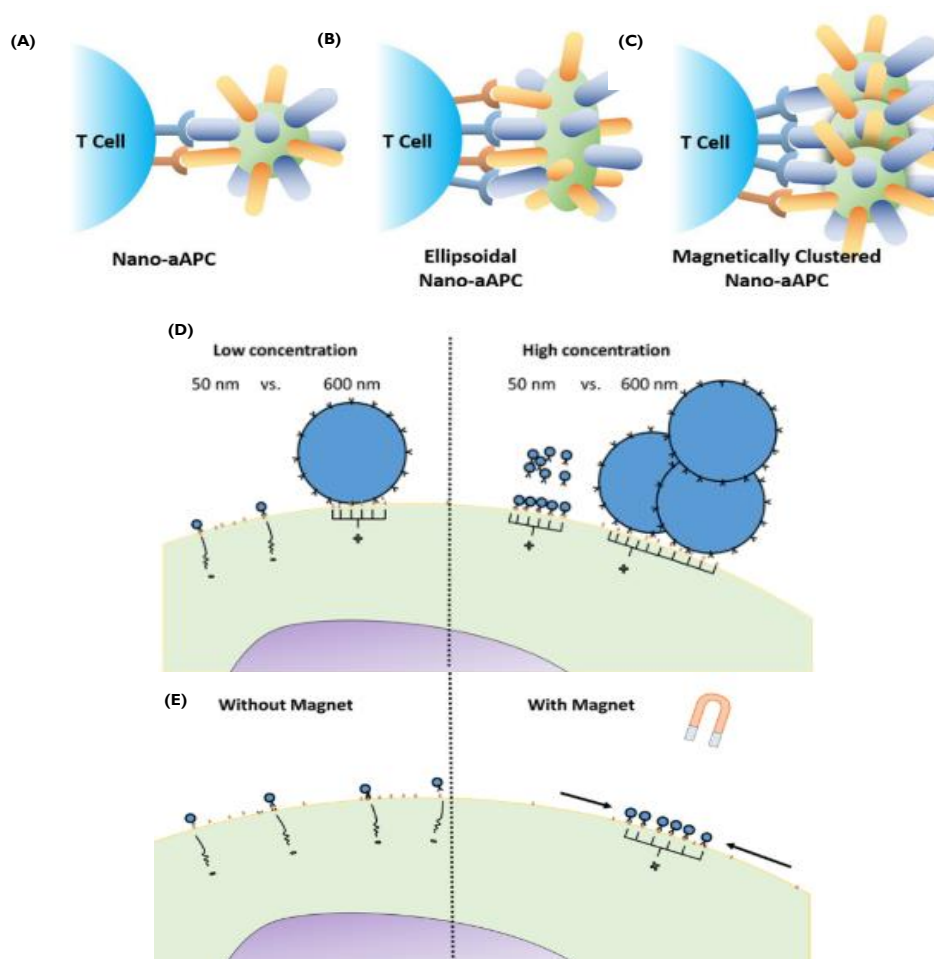
*In vitro*, MEYER *et al.* (2015) demonstraram que as nano-aAPCs de PLGA elipsoidais reduzem a captação por células não específicas, melhoram o tempo de semi-vida, por



diminuição da eliminação hepática e esplênica e estimulam melhor as células T, em comparação com nano-aAPCs de PLGA esféricas (MEYER *et al.*, 2015).

Na sequência deste estudo, o mesmo grupo administrou nano-aAPCs de PLGA elipsoidais via IV em *nude mice* (ZANG *et al.*, 2017). As nano-aAPCs de PLGA elipsoidais apresentam uma melhor biodistribuição *in vivo*, e desencadeiam uma ativação de células T 15 vezes superior à ativação com nano-aAPCs esféricas (HU, X. *et al.*, 2017; MEYER *et al.*, 2015). A ativação mais eficiente destas células deve-se à diminuição da curvatura e ao aumento da área de superfície das nano-aAPCs elipsoidais, promovendo um ótimo acúmulo, Figura 6 - (B).

WANG, C. *et al.* (2017) demonstraram que nano-aAPCs de PLGA ainda podem encapsular citocinas (exemplo: IL-2), bem como serem associadas a outras estratégias como a *immune checkpoint therapy* (exemplo: anti-PD-1).



**Figura 6-** (A) Design de Nano-aAPC; (B) Nano-aAPC elipsoidal; (C) e (E) MNPs; (D) Influência do tamanho e da concentração de Nano-aAPCs na ativação de células T. (Adaptado de HICKEY *et al.*, 2017; RHODES e GREEN, 2018).

### 3.3.2.2- Nanopartículas Magnéticas (MNPs)

Com objetivo de aumentar a superfície de contacto entre nano-aAPCs e células T, PERICA *et al.* (2015) construíram uma nanopartícula magnética biocompatível com um núcleo magnético de magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e superfície de dextrano (polissacárido de glucose), com 50 a 100 nm, funcionalizada com pMHC e mAb anti-CD28 (ZANG *et al.*, 2017). Estudos mencionam que nanopartículas com este diâmetro só ativam eficazmente as células T, se existirem doses saturantes (Figura 6 - (D)) ou agrupamento magnético artificial de nano-aAPCs (Figura 6 - (C) e (E)) (HICKEY *et al.*, 2017). O simples aumento da densidade dos ligantes numa aAPC de 50 nm não aumentou a capacidade de estimulação (HICKEY *et al.*, 2017).

A utilização de um campo magnético pode controlar o comportamento das aAPCs e impulsionar a formação de *clustering* “agrupamento” de TCR (PERICA *et al.*, 2015; ZANG *et al.*, 2017). Neste sentido, depois da ligação ao TCR, a aplicação de um campo magnético permite a agregação de nano-aAPCs, com posterior *clustering* de TCR, fortalecendo a sinalização e subsequente ativação de células T, Figura 6 - (E) (WANG, C. *et al.*, 2017).

A ACT *in vivo* de PERICA *et al.* (2015) em murganhos com modelo de melanoma B16, levou à completa regressão do tumor em 50 % dos murganhos, em comparação com o grupo controlo (nano-aAPCs não aglomeradas magneticamente).

### 3.3.2.3- Nanotubos de Carbono (CNTs)

Os CNTs resultam do enrolamento de folhas de grafeno, constituídas por átomos de carbono, onde as estruturas cilíndricas ocas de parede simples (SWCNTs) são as mais usadas por apresentarem uma grande área de superfície e flexibilidade (WANG, C. *et al.*, 2017).

Os CNTs podem ser usados na ATC *ex-vivo*, destacando o *nanotube-polymer composite* (CNP), referenciado em várias revisões (HONG e DOBROVOLSKAIA, 2018; HU, X. *et al.*, 2017; WANG, C. *et al.*, 2017). Foram construídos CNTs ligados a neutravidina, proteína com afinidade para a biotina e funcionalizados com pMHC e mAb anti-CD28, Anexo VI (HU, X. *et al.*, 2017). Posteriormente, uma NP de PLGA que incorpora IL-2 no núcleo magnético e funcionalizada à superfície com biotina foi adicionada aos CNTs formando o CNP que atua como aAPCs, Anexo VI (WANG, C. *et al.*, 2017).

A liberação parácrina de IL-2 das nanopartículas facilitou a apresentação de antígenos às células T, enquanto que as propriedades magnéticas permitiram a separação de CNPs das células T (HONG e DOBROVOLSKAIA, 2018; WANG, C. *et al.*, 2017). As células T isoladas, posteriormente expandidas, induziram um atraso significativo no crescimento do melanoma em murganhos (HONG e DOBROVOLSKAIA, 2018).

### **3.3.3- Modulação do Microambiente Tumoral (TME): modulação de células imunossupressoras**

Nanosistemas altamente sofisticados podem ser acumulados passivamente no TME, tirando partido do efeito reforçado da permeabilidade e retenção (EPR), ou podem ser acumulados ativamente utilizando estratégias de direcionamento como anticorpos (QIAO *et al.*, 2018; ZANG *et al.*, 2017). O EPR depende das fenestrações endoteliais do tumor, pelo que o tamanho das nanopartículas (10 a 100 nm), carga da superfície (negativa ou neutra), modificações de superfície (PEG) e estabilidade são características que facilitam o extravasamento e a possível retenção no TME (QIAO *et al.*, 2018).

Em seguida será abordada a modulação de TAMs, como um exemplo de modulação de células de imunossupressoras que influenciam a progressão e invasão do tumor (ZANG *et al.*, 2017).

#### **3.3.3.1- Modulação de TAMs**

São várias as estratégias propostas para reverter a ação dos TAMs, destacando-se a inversão da diferenciação do tipo M2 para o tipo M1 ou a eliminação do tipo M2 (SINGH *et al.*, 2017).

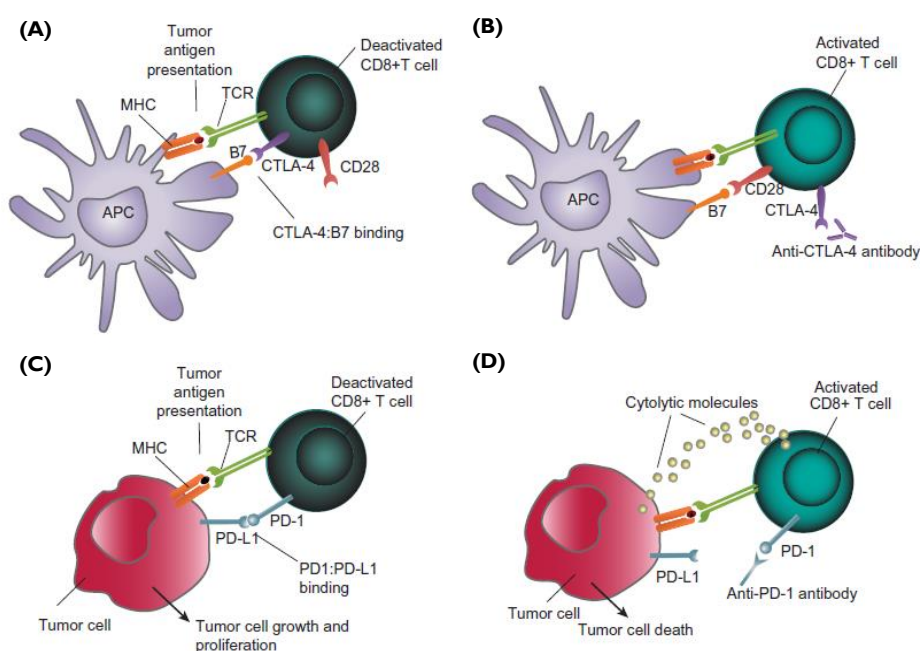
A IL-10 é responsável pela diferenciação de TAMs do tipo M1 para tipo M2, pelo que o estudo de HUANG *et al.* (2012) referenciado em vários artigos, trabalhou com base nesta premissa (SINGH *et al.*, 2017; ZANG *et al.*, 2017). Encapsularam CpG-DNA, anticorpos anti-IL-10 e anticorpos anti-recetores de IL-10 num nano-complexo formado por um núcleo de dextrano e superfície de carga positiva galactosilada, uma que vez os TAMs do tipo M2 apresentam elevados níveis de recetores de galactose (SINGH *et al.*, 2017). O pH do TME é ácido (5.6 - 7.0), como resultado dos iões H<sup>+</sup> gerados pelas células tumorais em hipóxia durante a glicólise, pelo que as nanopartículas são formadas por materiais sensíveis ao pH como o PEG-*histidine-modified alginate* (PHA) de forma a realizar uma entrega eficaz (HU, X. *et al.*, 2017; QIAO *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2017). Os estudos de HUANG *et al.*, (2012) em murinhos com carcinoma hepatocelular foi verificada uma diminuição da IL-10, como também um aumento da produção de IL-12 como resposta ao estímulo de ativação do recetor TLR-9 (HUANG *et al.*, 2012). O fenótipo com IL-12 elevada e IL-10 baixa foi associado a uma diminuição da expressão de genes específicos do tipo M2, indicando uma inversão bem sucedida do fenótipo, além de também diminuir o VEGF (HUANG *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2017).

Um estudo recente reporta que TAMs do tipo M2 (anti-inflamatórios) após exposição ao ferro ou ao grupo heme de glóbulos vermelhos hemolíticos (RBCs), mudam o seu fenótipo para TAMs do tipo M1 (pró-inflamatórios), isto é, ocorre uma diminuição da expressão de CD206 e aumenta a expressão de CD86 (DA SILVA *et al.*, 2017). Este princípio é benéfico no contexto do TME e foi mimetizado *in vivo* com nanopartículas magnéticas com óxido de ferro, de forma a fornecer ferro a TAMs, um dos nutrientes essenciais para o crescimento de células tumorais (DA SILVA *et al.*, 2017). A presença de TAMs contendo de ferro (iTAMs- *iron-loaded TAMs*) correlaciona-se com a redução do tamanho do tumor em doentes com cancro de pulmão de não pequenas células (NSCLC) (DA SILVA *et al.*, 2017).

Assim, esta estratégia adjuvante, simples, pode ser associada a outras estratégias de forma a obter respostas anti-tumorais de maior sucesso (DA SILVA *et al.*, 2017).

### 3.3.4- *Immune Checkpoint Therapy*

O PD-1 e o CTLA-4 são os *immune checkpoint* mais estudados e melhor caracterizados, Figura 7 (MARIN-ACEVEDO *et al.*, 2018). A sua atividade restringe a atividade das células T, uma vez que regulam negativamente a sua expansão. Contudo, novos *immune checkpoint* estão a ser investigados como o LAG-3 (CD223- *Lymphocyte activation gene-3*) e o TIM-3 (*T cell immunoglobulin-3*) (MARIN-ACEVEDO *et al.*, 2018).

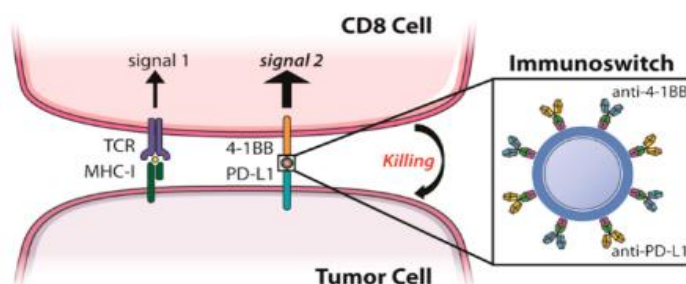


**Figura 7-** *Immune checkpoint therapy* com anticorpos e estado de ativação das células TCD8<sup>+</sup>. (DAVIES, 2014).

O bloqueio dos *immune checkpoint* juntamente com outras estratégias aumenta a eficácia da terapêutica antitumoral (WANG, Z. *et al.*, 2018).

De forma a interferir com a expressão de CTLA-4, foram sintetizadas **nanopartículas poliméricas** com um co-polímero (PEG e ácido polilático (PLA)) e um lípido catiónico, onde foi encapsulado um RNA de interferência/silenciamento (siRNA), formando nanopartículas<sub>siCTLA-4</sub> (YOON *et al.*, 2018). Estas são entregues às células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> *in vivo*, em murganhos com melanoma, resultando uma diminuição de RNA mensageiro (mRNA) e consequentemente uma diminuição (silenciamento) da proteína CTLA-4, com um aumento da ativação e proliferação de células T (LI *et al.*, 2016; YOON *et al.*, 2018).

De forma a ultrapassar o TME imunossupressor foi desenvolvida uma **nanopartícula magnética** (núcleo de magnetite e superfície de dextrano) com 80 nm funcionalizada com mAB agonistas do recetor 4-1BB e mAB antagonistas de PD-L1, Figura 8 (KOSMIDES *et al.*, 2017). Esta nanopartícula magnética é designada como “*Immunoswitch*” e é direcionada a células tumorais que expressam PD-L1, bloqueando a ligação ao PD-1 das células TCD8<sup>+</sup> (KOSMIDES *et al.*, 2017). Por outro lado, o mAB anti-4-1BB liga ao recetor 4-1BB estimulando a atividade das células T (KOSMIDES *et al.*, 2017). Resultados *in vivo* em murganhos com melanoma e cancro do colón mostram atividade antitumoral significativa, com aumento da ativação de células TCD8<sup>+</sup> do TME e diminuição do crescimento do tumor (KOSMIDES *et al.*, 2017).



**Figura 8-** Representação esquemática do “*Immunoswitch*”. (Adaptado de KOSMIDES *et al.*, 2017).

Um abordagem de tratamento inovadora resulta na co-administração de mAB antagonistas de PD-1 com mAB agonistas do recetor OX40 (MI *et al.*, 2018). A ativação de células T é ótima quando ambos interagem simultaneamente com a célula T, pelo que é usada a **DINP (dual immunotherapy nanoparticles) poliméricas de PEG-PLGA** esféricas com carga negativa e com  $166.9 \pm 6.5$  nm, de forma a realizar uma entrega precisa (MI *et al.*, 2018). Ensaio *in vitro* e *in vivo* demonstram a hipótese de que ligações simples ou sequenciais permitem uma ativação sub-ótima de células T, em comparação com a ligação simultânea (MI *et al.*, 2018).

## **CONCLUSÃO**

O sucesso dos ensaios clínicos é fundamental para a compreensão da dinâmica do sistema imunitário e para o entendimento das interações complexas do ciclo de imunidade contra o cancro. A otimização dos resultados clínicos passa por associar várias estratégias de tratamento com o objetivo de otimizar a estimulação do sistema imunitário, apesar de ainda existirem muitas lacunas.

Felizmente, a inovação na área da nanotecnologia, aleada à investigação em áreas paralelas, é capaz de melhorar a qualidade de vida dos doentes e, num futuro próximo, será capaz de tratar determinados cancros.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. - **Basic Immunology - Functions and Disorders of the Immune System**. 5ª Ed. Canada: Elsevier, 2016. ISBN: 9780323390828.
- ALMEIDA, J. P. M.; LIN, A. Y.; FIGUEROA, E. R.; FOSTER, A. E.; DREZEK, R. A. - **In vivo gold nanoparticle delivery of peptide vaccine induces anti-tumor immune response in prophylactic and therapeutic tumor models**. *Small*. 11, 12 (2015) 1453-1450.
- AROSA, F. A.; CARDOSO, E. M.; PACHECO, F. C. - **Fundamentos de Imunologia**. 2ª Ed. Porto: Lidel - edições técnicas, 2012. ISBN: 9789727578566.
- BUTTERFIELD, L. H. - **Cancer vaccines**. *BMJ (Clinical research ed.)*. 350, 5 (2015) 1-14.
- CHEN, D. S. - **Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle**. *Immunity*. 39, 1 (2013) 1-10.
- CHEN, D. S.; MELLMAN, I. - **Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point**. *Nature*. 541 (2017) 321-326.
- COGDILL, A. P.; ANDREWS, M. C.; WARGO, J. A. - **Hallmarks of response to immune checkpoint blockade**. *British Journal of Cancer*. 117, 1 (2017) 1-5.
- CRUZ, L. J.; ROSALIA, R. A.; KLEINOVINK, J. W.; RUEDA, F.; LÖWIK, C. W. G. M.; OSSENDORP, F. - **Targeting nanoparticles to CD40, DEC-205 or CD11c molecules on dendritic cells for efficient CD8<sup>+</sup>T cell response: A comparative study**. *Journal of Controlled Release*. 192 (2014) 209-214.
- DA SILVA, M. C. DA; BRECKWOLDT, M. O.; VINCHI, F.; CORREIA, M. P.; STOJANOVIC, A.; THIELMANN, C. M.; MEISTER, M.; MULEY, T.; WARTH, A.; PLATTEN, M.; HENTZE, M. W.; CERWENKA, A.; MUCKENTHALER, M. U. - **Iron induces anti-tumor activity in tumor-associated macrophages**. *Frontiers in Immunology*. 8 (2017) 1-11.
- DAVIES, M. - **New modalities of cancer treatment for NSCLC: Focus on immunotherapy**. *Cancer Management and Research*. 6, 1 (2014) 63-72.
- EL-BOUBBOU, K. - **Magnetic iron oxide nanoparticles as drug carriers: clinical relevance**. *Nanomedicine (Lond.)*. 13 (2018) 336.

- ESTANQUEIRO, M.; AMARAL, M. H.; CONCEIÇÃO, J.; LOBO, J. M. S. - **Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 126 (2015) 631-640.
- FAROOQ, M. U.; NOVOSAD, V.; ROZHKOVA, E. A.; WALI, H.; ALI, A.; FATEH, A. A.; NEOGI, P. B.; NEOGI, A.; WANG, Z. - **Gold Nanoparticles-enabled efficient dual delivery of anticancer therapeutics to heLa cells.** Scientific Reports. 8, 1 (2018) 1-12.
- FINN, O. J. - **The dawn of vaccines for cancer prevention.** Nature Reviews Immunology. 18, 3 (2018) 183-190.
- FONTANA, F.; LIU, D.; HIRVONEN, J.; SANTOS, H. A. - **Delivery of therapeutics with nanoparticles: what's new in cancer immunotherapy?.** Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. 9, 1 (2017) 1-19.
- GONG, J.; CHEHRAZI-RAFFLE, A.; REDDI, S.; SALGIA, R. - **Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations.** Journal for ImmunoTherapy of Cancer. 6, 1 (2018) 1-4.
- GOUBRAN, H. A.; KOTB, R. R.; STAKIW, J.; EMARA, M. E.; BURNOUF, T. - **Cancer Growth and Metastasis.** Cancer Growth and Metastasis. 7 (2014) 9-16.
- GRACIOTTI, M.; BERTI, C.; KLOK, H. A.; KANDALAFT, L. - **The era of bioengineering: How will this affect the next generation of cancer immunotherapy?.** Journal of Translational Medicine. 15, 1 (2017) 1-11.
- GRIMALDI, A. M.; INCORONATO, M.; SALVATORE, M.; SORICELLI, A. - **Nanoparticle-based strategies for cancer immunotherapy and immunodiagnostics.** Nanomedicine. 12 (2017) 1-5.
- GRIPPIN, A. J.; SAYOUR, E. J.; MITCHELL, D. A. - **Translational nanoparticle engineering for cancer vaccines.** OncoImmunology. 6, 10 (2017) 2-7.
- HICKEY, J. W.; VICENTE, F. P.; HOWARD, G. P.; MAO, H. Q.; SCHNECK, J. P. - **Biologically Inspired Design of Nanoparticle Artificial Antigen-Presenting Cells for Immunomodulation.** Nano Letters. 17, 11 (2017) 7045-7052.



- HONG, E.; DOBROVOLSKAIA, M. A. - **Addressing barriers to effective cancer immunotherapy with nanotechnology: Achievements, challenges, and roadmap to the next generation of nanoimmunotherapeutics.** *Advanced Drug Delivery Reviews.* 124 (2018) 1-10.
- HU, X.; WU, T.; BAO, Y.; ZHANG, Z. - **Nanotechnology based therapeutic modality to boost anti-tumor immunity and collapse tumor defense.** *Journal of Controlled Release.* 256 (2017) 26-40.
- HU, Z.; OTT, P. A.; WU, C. J. - **Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer.** *Nature Reviews Immunology.* 18, 3 (2018) 168-170.
- HUANG, Z.; ZHANG, Z.; JIANG, Y.; ZHANG, D.; CHEN, J.; DONG, L.; ZHANG, J. - **Targeted delivery of oligonucleotides into tumor-associated macrophages for cancer immunotherapy.** *Journal of Controlled Release.* 158, 2 (2012) 286-288.
- HUME, H. K. C.; LUA, L. H. L. - **Platform technologies for modern vaccine manufacturing.** *Vaccine.* 35 (2017) 4480-4480.
- IMV INC. - **Effecting Synergistic Mechanisms of Action to Attack Hard-to-Treat Cancers.** 2018a. [Acedido a 10 de junho de 2018]. Disponível na Internet: <https://imv-inc.com/pipeline/clinical-trials/dpx-survivac/>
- JIANG, H.; WANG, Q.; SUN, X. - **Lymph node targeting strategies to improve vaccination efficacy.** *Journal of Controlled Release.* 267 (2017) 47-51.
- JO, S. D.; NAM, G. H.; KWAK, G.; YANG, Y.; KWON, I. C. - **Harnessing designed nanoparticles: Current strategies and future perspectives in cancer immunotherapy.** *Nano Today.* 17 (2017) 23-34.
- KAPADIA, C. H.; PERRY, J. L.; TIAN, S.; LUFT, J. C.; DESIMONE, J. M. - **Nanoparticulate immunotherapy for cancer.** *Journal of Controlled Release.* 219 (2015) 167-178.
- KARKADA, M.; BERINSTEIN, N. L.; MANSOUR, M. - **Therapeutic vaccines and cancer: Focus on DPX-0907.** *Biologics: Targets and Therapy.* 8 (2014) 27-30.
- KOSMIDES, A. K.; SIDHOM, J. W.; FRASER, A.; BESSELL, C. A.; SCHNECK, J. P. - **Dual targeting nanoparticle stimulates the immune system to inhibit tumor growth.** *ACS Nano.* 11, 6 (2017) 5417-5422.

- LI, S. Y.; LIU, Y.; XU, C. F.; SHEN, S.; SUN, R.; DU, X. J.; XIA, J. X.; ZHU, Y. H.; WANG, J. - **Restoring anti-tumor functions of T cells via nanoparticle-mediated immune checkpoint modulation.** *Journal of Controlled Release.* 231 (2016) 17-20.
- LUO, M.; SAMANDI, L. Z.; WANG, Z.; CHEN, Z. J.; GAO, J. - **Synthetic nanovaccines for immunotherapy.** *Journal of Controlled Release.* 263 (2017) 200-204.
- MAHONEY, K. M.; RENNERT, P. D.; FREEMAN, G. J. - **Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets.** *Nature Reviews Drug Discovery.* 14, 8 (2015) 561-565.
- MALE, D.; BROSTOFF, J.; ROTH, D. B.; ROITT, I. - **Immunology.** 8<sup>a</sup> Ed. Canada: Elsevier, 2013. ISBN: 978032308058.
- MANDAL, S.; HAMMINK, R.; TEL, J.; EKSTEEN-AKEROYD, Z. H.; ROWAN, A. E.; BLANK, K.; FIGDOR, C. G. - **Polymer-based synthetic dendritic cells for tailoring robust and multifunctional T cell responses.** *ACS Chemical Biology.* 10, 2 (2015) 485-489.
- MARIN-ACEVEDO, J. A.; DHOLARIA, B.; SOYANO, A. E.; KNUTSON, K. L.; CHUMSRI, S.; LOU, Y. - **Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges.** *Journal of Hematology & Oncology.* 11, 1 (2018) 1-3.
- MEYER, R. A.; SUNSHINE, J. C.; PERICA, K.; KOSMIDES, A. K.; AJE, K.; SCHNECK, J. P.; GREEN, J. J. - **Biodegradable Nanoellipsoidal Artificial Antigen Presenting Cells for Antigen Specific T-Cell Activation.** *Small.* 11, 13 (2015) 1519-1523.
- MI, Y.; SMITH, C. C.; YANG, F.; QI, Y.; ROCHE, K. C.; SERODY, J. S.; VINCENT, B. G.; WANG, A. Z. - **A Dual Immunotherapy Nanoparticle Improves T-Cell Activation and Cancer Immunotherapy.** *Advanced Materials.* 30 (2018) 1-8.
- MINTZER, M. A.; SIMANEK, E. E. - **Nonviral vectors for gene delivery.** *Chemical Reviews.* 109, 2 (2009) 259-270.
- NELSON, D.; FISHER, S.; ROBINSON, B. - **The «trojan Horse» approach to tumor immunotherapy: Targeting the tumor microenvironment.** *Journal of Immunology Research.* 2014 (2014) 1-5.
- NUNES-HASLER, P.; MASCHALIDI, S.; LIPPENS, C.; CASTELBOU, C.; BOUVET, S.; GUIDO, D.; BERMONT, F.; BASSOY, E. Y.; PAGE, N.; MERKLER, D.; HUGUES, S.; MARTINVALET, D.; MANOURY, B.; DEMAUREX, N. - **STIMI promotes migration,**

**phagosomal maturation and antigen cross-presentation in dendritic cells.** Nature Communications. 8, 1 (2017) 1-3.

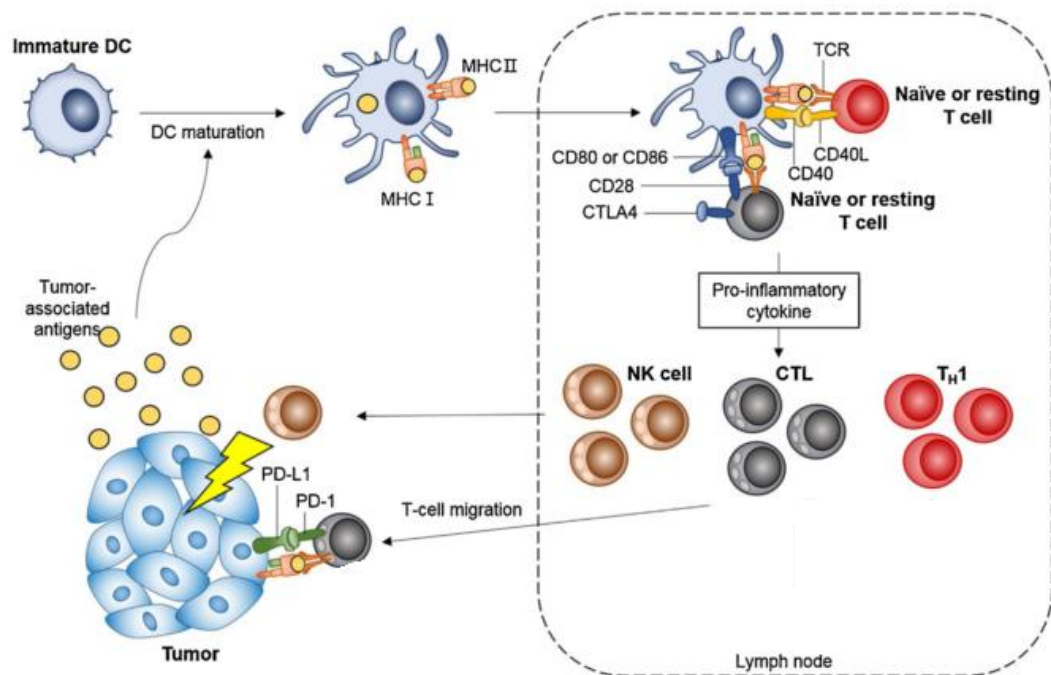
- PERICA, K.; BIELER, J. G.; SCHU, C.; VARELA, J. C.; DOUGLASS, J.; SKORA, A.; CHIU, Y. L.; OELKE, M.; KINZLER, K.; ZHOU, S.; VOGELSTEIN, B.; SCHNECK, J. P. - **Enrichment and expansion with nanoscale artificial antigen presenting cells for adoptive immunotherapy.** ACS Nano. 9, 7 (2015) 6861-6867.
- QIAO, Y.; WAN, J.; ZHOU, L.; MA, W.; YANG, Y.; LUO, W. - **Stimuli-responsive nanotherapeutics for precision drug delivery and cancer therapy.** Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. e1527 (2018) 1-12.
- QIU, H.; MIN, Y.; RODGERS, Z.; ZHANG, L.; WANG, A. Z. - **Nanomedicine approaches to improve cancer immunotherapy.** Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. 9, 5 (2017) 1-11.
- QUACH, Q. H.; KONG, R. L. X.; KAH, J. C. Y. - Complement Activation by PEGylated Gold Nanoparticles. Bioconjugate Chemistry. 29 (2018) 976-978.
- RHODES, K. R.; GREEN, J. J. - **Nanoscale artificial antigen presenting cells for cancer immunotherapy.** Molecular Immunology. 98 (2018) 13-16.
- RICHARDS, D. A.; MARUANI, A.; CHUDASAMA, V. - **Antibody fragments as nanoparticle targeting ligands: a step in the right direction.** Chem. Sci.. 8, 1 (2017) 63-70.
- ROCHE - **Explorando a via de sinalização PD-L1.** 2017. [Acedido a 12 de junho de 2018]. Disponível na Internet: [https://www.rochenet.pt/content/dam/hcp-portals/portugal/documents/pt\\_ImunoterapiaBrochuraMoA.pdf](https://www.rochenet.pt/content/dam/hcp-portals/portugal/documents/pt_ImunoterapiaBrochuraMoA.pdf)
- ROSALIA, R. A.; CRUZ, L. J.; VAN DUIKEREN, S.; TROMP, A. T.; SILVA, A. L.; JISKOOT, W.; GRUIJL, T. DE; LÖWIK, C.; OOSTENDORP, J.; VAN DER BURG, S. H.; OSSENDORP, F. - **CD40-targeted dendritic cell delivery of PLGA-nanoparticle vaccines induce potent anti-tumor responses.** Biomaterials. 40 (2015) 88-91.
- SANGTANI, A.; NAG, O. K.; FIELD, L. D.; BREGER, J. C.; DELEHANTY, J. B. - **Multifunctional nanoparticle composites: progress in the use of soft and hard nanoparticles for drug delivery and imaging.** Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. 9, 6 (2017) 1-23.

- SAU, S.; ALSAAB, H. O.; BHISE, K.; ALZHRANI, R.; NABIL, G.; IYER, A. K. - **Multifunctional nanoparticles for cancer immunotherapy: A groundbreaking approach for reprogramming malfunctioned tumor environment.** Journal of Controlled Release. 274 (2018) 24-31.
- SCHMID, D.; PARK, C. G.; HARTL, C. A.; SUBEDI, N.; CARTWRIGHT, A. N.; PUERTO, R. B.; ZHENG, Y.; MAIARANA, J.; FREEMAN, G. J.; WUCHERPFENNIG, K. W.; IRVINE, D. J.; GOLDBERG, M. S. - **T cell-targeting nanoparticles focus delivery of immunotherapy to improve antitumor immunity.** Nature Communications. 8, 1 (2017) 1-9.
- SHAO, K.; SINGHA, S.; CLEMENTE-CASARES, X.; TSAI, S.; YANG, Y.; SANTAMARIA, P. - **Nanoparticle-Based Immunotherapy for Cancer.** ACS Nano. 9, 1 (2015) 16-20.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. - **Cancer statistics, 2017.** CA: A Cancer Journal for Clinicians. 67, 1 (2017) 7-9.
- SINGH, Y.; PAWAR, V. K.; MEHER, J. G.; RAVAL, K.; KUMAR, A.; SHRIVASTAVA, R.; BHADARIA, S.; CHOURASIA, M. K. - **Targeting tumor associated macrophages (TAMs) via nanocarriers.** Journal of Controlled Release. 254 (2017) 92-100.
- TAKAHASHI, K.; EHATA, S. - **Pancreatic tumor microenvironment confers highly malignant properties on pancreatic cancer cells.** Oncogene. 37 (2018) 2757-2759.
- TRAN, T. H.; TRAN, T. T. P.; NGUYEN, H. T.; PHUNG, C. D.; JEONG, J. H.; STENZEL, M. H.; JIN, S. G.; YONG, C. S.; TRUONG, D. H.; KIM, J. O. - **Nanoparticles for dendritic cell-based immunotherapy.** International Journal of Pharmaceutics. 542 (2018) 253-263.
- TUNGER, A.; KIESSLER, M.; WEHNER, R.; TEMME, A.; MEIER, F.; BACHMANN, M.; SCHMITZ, M. - **Immune Monitoring of Cancer Patients Prior to and During CTLA-4 or PD-1/PD-L1 Inhibitor Treatment.** Biomedicines. 6 (2018) 1-10.
- VALKENBURG, K. C.; GROOT, A. E. De; PIENIA, K. J. - **Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy.** Nature Reviews Clinical Oncology. 15 (2018) 266-377.
- VAN DER BURG, S. H.; ARENS, R.; OSSENDORP, F.; VAN HALL, T.; MELIEF, C. J. M. - **Vaccines for established cancer: Overcoming the challenges posed by immune evasion.** Nature Reviews Cancer. 16, 4 (2016) 219-223.

- VAN DER WOUDE, L. L.; GORRIS, M. A. J.; HALILOVIC, A.; FIGDOR, C. G.; VRIES, I. J. M. DE - **Migrating into the Tumor: a Roadmap for T Cells**. Trends in Cancer. 3, 11 (2017) 797-805.
- WANG, C.; SUN, W.; YE, Y.; BOMBA, H. N.; GU, Z. - **Bioengineering of artificial antigen presenting cells and lymphoid organs**. Theranostics. 7, 14 (2017) 3504-3510.
- WANG, Z.; LIU, W.; SHI, J.; CHEN, N.; FAN, C. - **Nanoscale delivery systems for cancer immunotherapy**. Materials Horizons. 5, 3 (2018) 344-354.
- YOON, H. Y.; SELVAN, S. T.; YANG, Y.; KIM, M. J.; YI, D. K.; KWON, I. C.; KIM, K. - **Engineering nanoparticle strategies for effective cancer immunotherapy**. Biomaterials. 178 (2018) 597-600.
- YOSHIZAKI, Y.; YUBA, E.; SAKAGUCHI, N.; KOIWAI, K.; HARADA, A.; KONO, K. - **pH-sensitive polymer-modified liposome-based immunity-inducing system: Effects of inclusion of cationic lipid and CpG-DNA**. Biomaterials. 141 (2017) 272-277.
- ZANG, X.; ZHAO, X.; HU, H.; QIAO, M.; DENG, Y.; CHEN, D. - **Nanoparticles for tumor immunotherapy**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 115 (2017) 243-253.
- ZHANG, P.; CHIU, Y. C.; TOSTANOSKI, L. H.; JEWELL, C. M. - **Polyelectrolyte Multilayers Assembled Entirely from Immune Signals on Gold Nanoparticle Templates Promote Antigen-Specific T Cell Response**. ACS Nano. 9, 6 (2015) 6465-6470.
- ZHU, G.; ZHANG, F.; NI, Q.; NIU, G.; CHEN, X. - **Efficient Nanovaccine Delivery in Cancer Immunotherapy**. ACS Nano. 11, 3 (2017) 2387-2389.

## ANEXOS

### ANEXO I



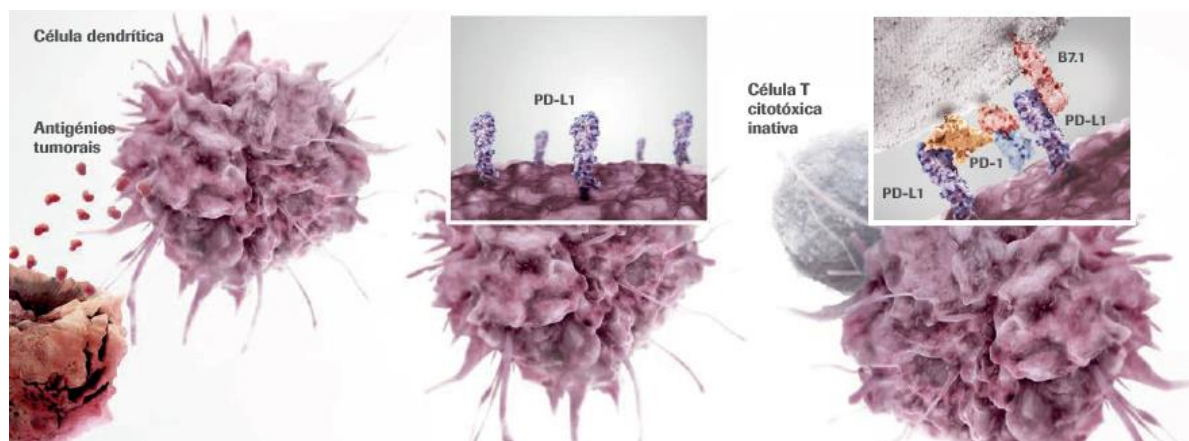
**Figura I** - Captura e apresentação de antígenos por DC e ativação da célula T *naive*, induzindo uma resposta contra o tumor. (Adaptado de JO *et al.*, 2017).

#### Referências bibliográficas:

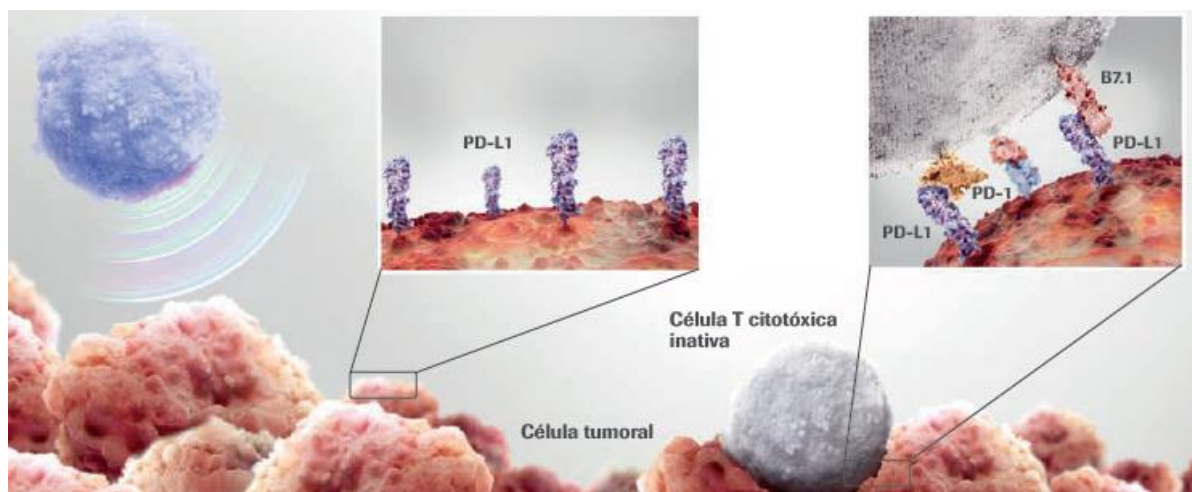
- JO, S. D.; NAM, G. H.; KWAK, G.; YANG, Y.; KWON, I. C. - **Harnessing designed nanoparticles: Current strategies and future perspectives in cancer immunotherapy.** Nano Today. 17 (2017) 25.

## ANEXO II

(A)



(B)

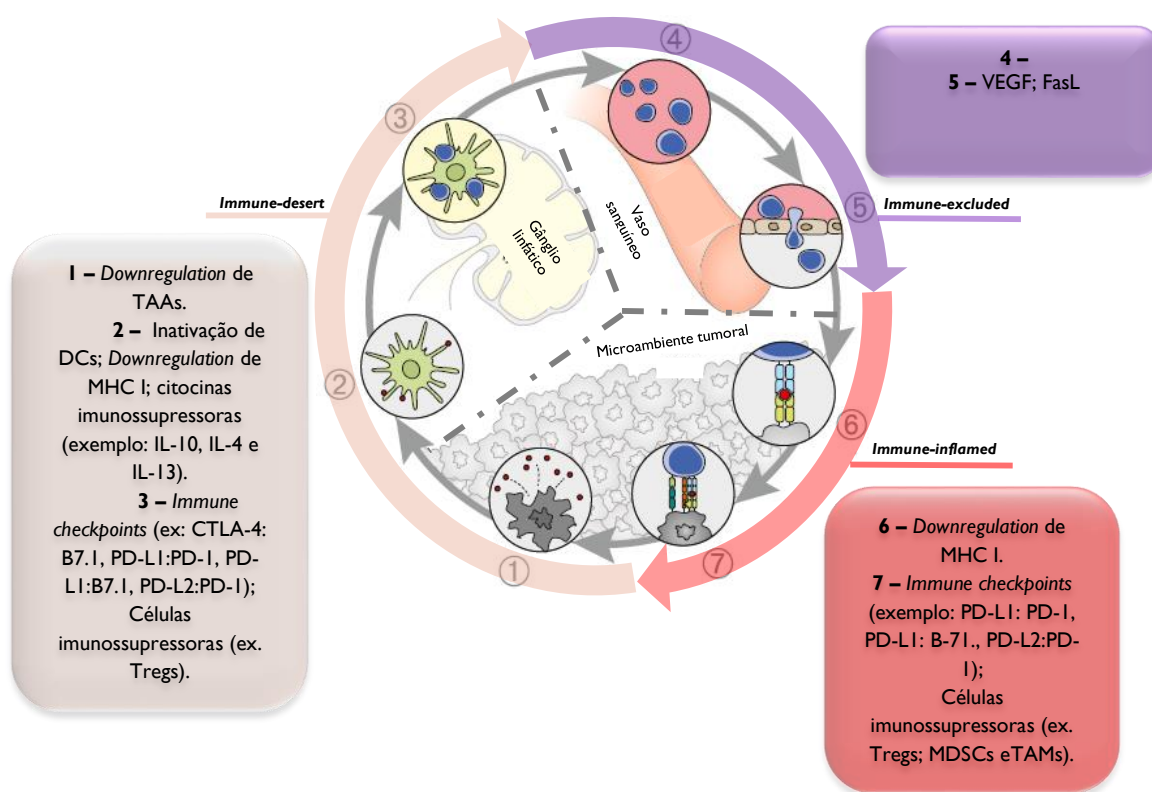


**Figura 2-** Perturbação do ciclo de imunidade contra o cancro pelo PD-L1 nos gânglios linfáticos (A) e no microambiente tumoral (B). ROCHE, 2017.

### Referências bibliográficas:

- ROCHE - **Explorando a via de sinalização PD-L1**. 2017. [Acedido a 12 de junho de 2018]. Disponível na Internet: [https://www.rochenet.pt/content/dam/hcp-portals/portugal/documents/pt\\_ImunoterapiaBrochuraMoA.pdf](https://www.rochenet.pt/content/dam/hcp-portals/portugal/documents/pt_ImunoterapiaBrochuraMoA.pdf)

## ANEXO III



**Figura 3-** Vários mecanismos de escape ao sistema imunitário. (Adaptado de CHEN, 2013; CHEN e MELLMAN, 2017; GRACIOTTI *et al.*, 2017; QIU *et al.*, 2017).

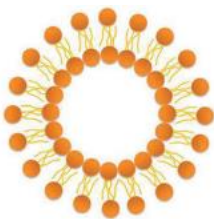


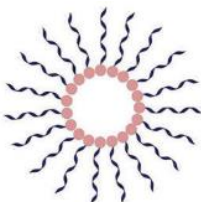
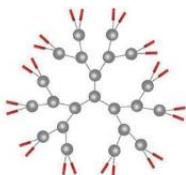
### Referências bibliográficas:

- CHEN, D. S. - **Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle.** *Immunity.* 39, 1 (2013) 1-10.
- CHEN, D. S.; MELLMAN, I. - **Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point.** *Nature.* 541 (2017) 321-326.
- GRACIOTTI, M.; BERTI, C.; KLOK, H. A.; KANDALAFT, L. - **The era of bioengineering: How will this affect the next generation of cancer immunotherapy?.** *Journal of Translational Medicine.* 15, 1 (2017) 1-11.
- QIU, H.; MIN, Y.; RODGERS, Z.; ZHANG, L.; WANG, A. Z. - **Nanomedicine approaches to improve cancer immunotherapy.** *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology.* 9, 5 (2017) 1-11.

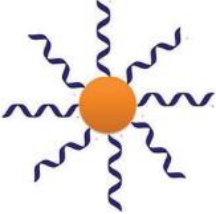

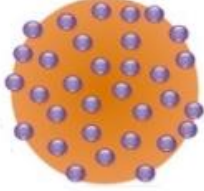



## ANEXO IV

**Tabela I-** Classificação, representação esquemática e características das nanopartículas. (Adaptado de EL-BOUBOU, 2018; GRACIOTTI *et al.*, 2017; HU *et al.*, 2017; QIU *et al.*, 2017; RICHARDS *et al.*, 2017).

Classificação	Nanopartículas	Representação esquemática	Características
Nanopartícula orgânica de base lipídica	Lipossomas		Resultam da organização espontânea de uma ou mais bicamadas de fosfolípidos para formar vesículas lipídicas. Vetores biocompatíveis e não tóxicos de encapsulação e transporte de fármacos hidrofóbicos e/ou hidrofílicos.
Nanopartículas orgânicas de base polimérica	Nanoesferas		Sistemas de matriz onde o fármaco encapsulado se encontra disperso por toda a matriz polimérica.
	Nanocápsulas		Sistemas vesiculares onde o fármaco é encapsulado no núcleo hidrofílico delimitado por uma única membrana polimérica.
	Micelas poliméricas		Acima do valor de concentração micelar crítica, juntamente com a presença de co-polímeros anfífilicos e moléculas surfactantes em solução aquosa, a formação destas vesículas é espontânea. Apresentam um núcleo polimérico hidrofóbico, rodeado por cadeias poliméricas hidrofílicas, que permite a encapsulação de fármacos hidrofóbicos.
	Dendrímeros		Moléculas obtidas pela construção de um núcleo central, com posterior repetição de camadas simétricas com disposição radial, os dendrões. São solúveis em água, não imunogênicas e com elevada capacidade de carga no seu interior.

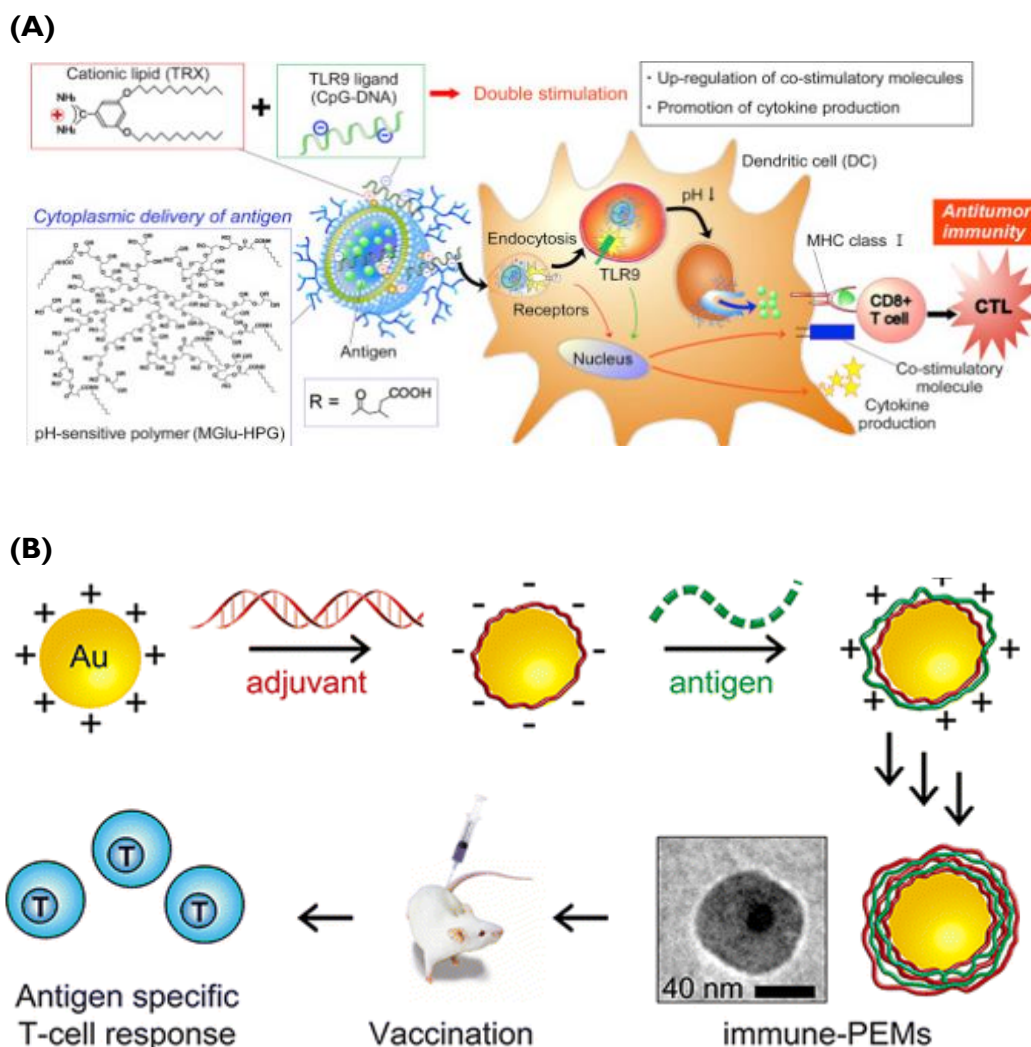
**Tabela 1-** Classificação, representação esquemática e características das nanopartículas. (Adaptado de EL-BOUBBOU, 2018; GRACIOTTI *et al.*, 2017; HU *et al.*, 2017; QIU *et al.*, 2017; RICHARDS *et al.*, 2017). (Continuação).

Classificação	Nanopartículas	Representação esquemática	Características
Nanopartículas Inorgânicas	Nanopartículas metálicas		As nanopartículas de ouro destacam-se no grupo das nanopartículas metálicas (ouro e prata) pela sua fácil produção, alta estabilidade e facilidade em serem fagocitadas pelas células mononucleares. Apresentam propriedades óticas inatas. Caracterizam-se por serem inertes e pela variedade de aplicações: terapia fototérmica (TFT), vetores para a entrega de fármacos, TAAAs, entre outras.
	Nanopartículas de carbono		Os nanotubos de carbono, fulerenos, nanodiamantes e grafeno faz parte dos nanomateriais de carbono. Os nanotubos têm sido alvo de bastante investigação e merecem particular destaque. Apresentam características eletroquímicas, térmicas, óticas, flexibilidade e baixa densidade. São vetores para a entrega de fármacos que são incorporados na cavidade interna ou funcionalizados à superfície w entrega de radionuclídeos.
	Nanopartículas cerâmicas		A sílica e alumina são materiais cerâmicos com aplicação na nanomedicina. As nanopartícula mesoporosas de sílica (MSNPs) apresentam uma matriz de sílica com poros de diâmetro entre 2 nm a 50 nm. São sistemas ocos biocompatíveis, não-tóxicos, porosidade controlável e grande área superficial que lhes confere elevada capacidade de carga.
	Nanopartículas magnéticas		As MNPs, são constituídas tipicamente por núcleo de magnetite ( $Fe_3O_4$ ) e por um revestimento polimérico biocompatível de dextrano ou amido. Apresentam propriedade magnéticas inatas com aplicação no tratamento e diagnóstico de cancro.

**Referências bibliográficas:**

- EL-BOUBBOU, K. - **Magnetic iron oxide nanoparticles as drug carriers: clinical relevance.** *Nanomedicine (Lond.)*. 13 (2018) 336.
- GRACIOTTI, M.; BERTI, C.; KLOK, H. A.; KANDALAFT, L. - **The era of bioengineering: How will this affect the next generation of cancer immunotherapy?.** *Journal of Translational Medicine*. 15, 1 (2017) 1-11.
- HU, X.; WU, T.; BAO, Y.; ZHANG, Z. - **Nanotechnology based therapeutic modality to boost anti-tumor immunity and collapse tumor defense.** *Journal of Controlled Release*. 256 (2017) 26-40.
- QIU, H.; MIN, Y.; RODGERS, Z.; ZHANG, L.; WANG, A. Z. - **Nanomedicine approaches to improve cancer immunotherapy.** *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 9, 5 (2017) 1-11.
- RICHARDS, D. A.; MARUANI, A.; CHUDASAMA, V. - **Antibody fragments as nanoparticle targeting ligands: a step in the right direction.** *Chem. Sci.* 8, 1 (2017) 63-70.

## ANEXO V

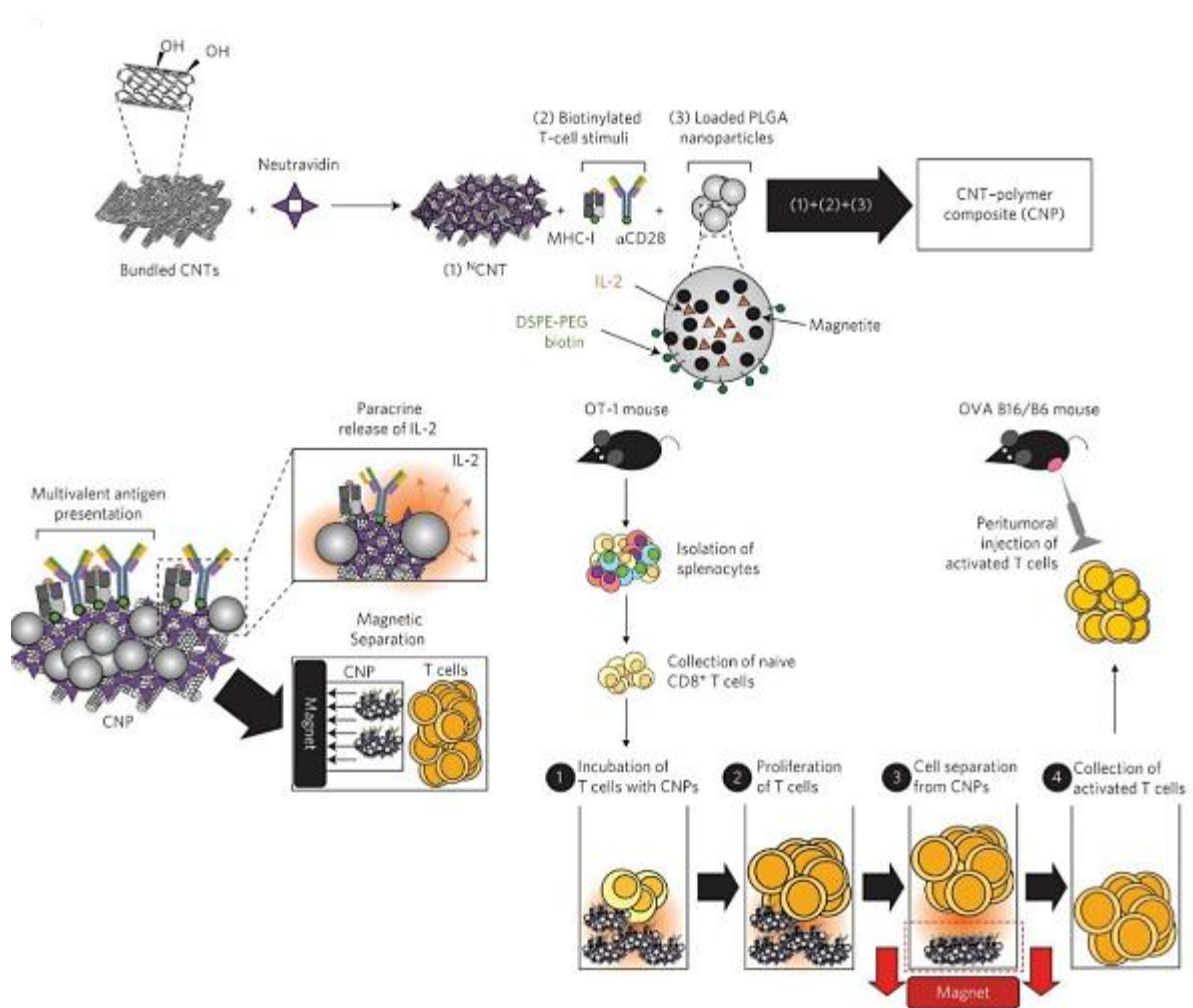


**Figura 4-** Representação de dois exemplos de nanovacinas: (A) Lipossoma e (B) AuNPs. (Adaptado de FONTANA *et al.*, 2017; YOSHIZAKI *et al.*, 2017).

### Referências bibliográficas:

- FONTANA, F.; LIU, D.; HIRVONEN, J.; SANTOS, H. A. - **Delivery of therapeutics with nanoparticles: what's new in cancer immunotherapy?.** Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. 9, 1 (2017) 1-19.
- YOSHIZAKI, Y.; YUBA, E.; SAKAGUCHI, N.; KOIWA, K.; HARADA, A.; KONO, K. - **pH-sensitive polymer-modified liposome-based immunity-inducing system: Effects of inclusion of cationic lipid and CpG-DNA.** Biomaterials. 141 (2017) 272-277.

## ANEXO VI



**Figura 5-** Representação do *nanotube-polymer composite* (CNP). (WANG, C. *et al.*, 2017).

### Referências bibliográficas:

- WANG, C.; SUN, W.; YE, Y.; BOMBA, H. N.; GU, Z. - **Bioengineering of artificial antigen presenting cells and lymphoid organs.** *Theranostics*. 7, 14 (2017) 3509.