

Teresa Raquel Tremoço Dias de Abreu

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “As Células CAR-T como uma Terapia Anti-Cancerígena: Desafios Atuais e Oportunidades Futuras” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, do Dr. Paulo Monteiro, da Dra. Dina Lopes e do Professor Doutor João Nuno 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

Teresa Raquel Tremeço Dias de Abreu

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “As Células CAR-T como uma Terapia Anti-Cancerígena: Desafios Atuais e Oportunidades Futuras” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, do Dr. Paulo Monteiro, da Dra. Dina Lopes e do Professor Doutor João Nuno 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

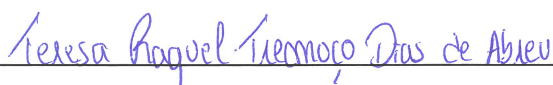


UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Teresa Raquel Tremoço Dias de Abreu, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2013135675, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “As Células CAR-T como uma terapia anticancerígena – desafios atuais e oportunidades futuras” 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, 03 de setembro de 2018.



(Teresa Raquel Tremoço Dias de Abreu)

Agradecimentos

Aos meus pais, por todo o carinho e conforto nas horas difíceis e pelo apoio incondicional durante todo o meu percurso académico. Tudo o que consegui até hoje foi graças a vocês.

À minha irmã Eduarda, que mesmo estando separada de mim por meio oceano, de tudo faz para estar presente nos momentos mais importantes. Para ti, um obrigada nunca chegará.

Ao Luís, por tudo, ou quase tudo, na verdade. Sem ti, nada seria o mesmo.

À pequena Constança, por me fazer sorrir a toda hora.

Aos meus avós, aos meus tios e aos meus primos por estarem sempre presentes.

Ao Professor Doutor João Nuno Moreira, pelo exemplo de docente que é e por todo o apoio, dedicação e disponibilidade.

A toda equipa da farmácia S. José e em especial ao Dr. Paulo Monteiro, por todo o carinho, amabilidade e disponibilidade que demonstraram no decorrer do meu estágio.

À Dr.^a Dina Cordeiro Lopes e a todos os colaboradores da equipa da DAM do INFARMED, I. P., pelos conhecimentos que partilharam comigo e por todo o apoio dado durante a realização das minhas tarefas.

À Parra, à Francisca, à Daniela, à Tânia e ao Tiago por terem sido o meu suporte durante estes cinco anos. Levo-vos comigo.

À Maria e à Margarida, por toda a amizade construída durante estes anos. O meu percurso académico não seria o mesmo sem vocês. Levo-vos comigo, também.

Aos docentes da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pelos princípios e valores transmitidos. Espero que se orgulhem do meu percurso.

A Coimbra, pelo percurso que me deste. Voltarei, sempre, para ti.

A todos vocês, um sincero Obrigada.

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Parte II

Relatório de Estágio em Assuntos Regulamentares do Medicamento na
Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P.

Parte III

Monografia

*As Células CAR-T como uma terapia anticancerígena – desafios atuais e
oportunidades futuras*

Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas.....	8
1. Introdução.....	9
2. Análise SWOT.....	10
A. Pontos Fortes.....	10
A.1. Localização e horário de funcionamento alargado.....	10
A.2. Equipa técnica.....	10
A.3. Diversidade de produtos.....	11
A.4. Diversidade de tarefas desempenhadas.....	11
• Atendimento ao Público.....	11
• Gestão de encomendas e arrumação dos produtos.....	12
• Gestão do <i>stock</i>	13
• Conferência do receiturário.....	13
• Preparação de medicamentos manipulados.....	13
A.5. Serviços diferenciados.....	14
A.6. Importância do <i>Robot</i> e do <i>Cash Guard</i>	14
A.7. Dinamização e gestão do espaço físico da farmácia.....	15
B. Pontos Fracos.....	15
B.1. Componente prática do MICF.....	15
B.2. Plano de estágio.....	16
C. Oportunidades.....	16
C.1. Sifarma 2000®.....	16
C.2. Prescrição por Receita Eletrónica desmaterializada.....	17
C.3. Filosofia Kaizen.....	17
C.4. Programa Valormed.....	17
C.5. Formação Contínua.....	18
D. Ameaças.....	19
D.1. Impacto da venda de MNSRM e dispositivos médicos fora da farmácia...	19
D.2. Medicamentos esgotados.....	19
D.3. Falta de credibilidade nos Medicamentos Genéricos.....	20
3. Aplicação de Conhecimentos - Casos Clínicos.....	20
4. Conclusão.....	22
5. Bibliografia.....	23
6. Anexos.....	25

Parte II – Relatório de Estágio em Assuntos Regulamentares do Medicamento

Lista de Abreviaturas.....	28
1. Introdução.....	29
2. Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.....	29
2.1. Direção de Avaliação de Medicamentos - Unidade de Manutenção no Mercado.....	30
3. Análise SWOT.....	31
A. Pontos Fortes.....	31
A.1. Integração e Acolhimento inicial.....	31
A.2. Equipa técnica da UMM / PT-EMR.....	31
A.3. Tarefas desempenhadas.....	32
A.4. Autonomia e Responsabilidade.....	32
A.5. Competências Desenvolvidas.....	33
B. Pontos Fracos.....	33
B.1. Foco único em processos de Renovação.....	33
B.2. Fluxo de trabalho irregular.....	34
C. Oportunidades.....	34
C.1. Submissão eletrónica dos processos via SMUH-ALTER.....	34
C.2. Assistir a uma reunião da Comissão de Avaliação de Medicamentos.....	35
C.3. Visita às instalações do Laboratório do Infarmed.....	35
C.4. Contacto com profissionais das equipas UMM/ PT-EMR e UIM/PT-EMR".....	35
D. Ameaças.....	36
D.1. Falha nos recursos tecnológicos.....	36
4. Conclusão.....	36
5. Bibliografia.....	37
6. Anexos.....	38

Parte III – Monografia

Lista de Abreviaturas.....	40
Resumo.....	42
<i>Abstract</i>	43
I. Introdução.....	44
II. Células CAR-T.....	45
Da primeira geração às <i>Smart T cells</i>	45

	Processo de produção das células CAR-T.....	48
	As células CAR-T na prática clínica.....	49
III.	Aprovações baseadas na tecnologia das células CAR-T.....	51
	Os <i>first-in-class</i> da terapia com células CAR-T.....	51
	<i>Pipeline</i> emergente.....	54
IV.	Toxicidade associada às células CAR-T.....	59
	Mecanismos de Toxicidade.....	60
	Promoção da segurança <i>in vivo</i> das células CAR-T.....	64
V.	O futuro das Células CAR-T.....	65
	O desafio dos tumores sólidos.....	65
	<i>Designs</i> do futuro – o SUPRA CAR.....	66
VI.	Conclusão.....	68
VII.	Bibliografia.....	70

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas

ANF - Associação Nacional das Farmácias Portuguesas

APA - Agência Portuguesa do Ambiente

CCF - Centro de Conferência de Faturas

CEDIME - Centro de Informação do Medicamento

CHUC - Centro Hospitalar Universitário de Coimbra

DCI - Denominação Comum Internacional

FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FSJ - Farmácia São José

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM - Medicamentos não sujeitos a receita médica

MSRM - Medicamentos sujeitos a receita médica

MUH - Medicamentos de Uso Humano

PNV - Programa Nacional de Vacinação

PVP - Preço de Venda ao Público

SNS - Sistema Nacional de Saúde

SWOT - *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

I. Introdução

Cada vez mais os farmacêuticos são os profissionais de saúde que mais próximo se encontram da globalidade da população, acabando por ser estes a estabelecer, na Farmácia Comunitária, o primeiro contacto com o utente, antes do aconselhamento médico. O farmacêutico não é um mero especialista do medicamento, é um agente promotor e defensor da saúde pública, que tem como primeira responsabilidade o bem-estar e a saúde do doente e do cidadão em geral¹. Os seus atos devem reger-se pelos princípios do uso racional do medicamento, pela garantia da dispensa de medicamentos com qualidade, eficácia e segurança e pela promoção da adesão à terapêutica, devendo estar cientes da sua responsabilidade pelos *outcomes* de cada terapêutica instituída. Só o farmacêutico detém o conhecimento científico adequado para aconselhar em situações de automedicação e indicação farmacêutica, cedendo os fármacos apropriados, de forma a minimizar as reações adversas e as interações medicamentosas e a garantir eficácia terapêutica. De facto, as funções de um farmacêutico são inumeráveis, não pela sua quantidade, mas pelo seu valor e impacto na educação para a saúde dos utentes.

Após os quatro anos e meio de formação teórica e prática do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), o estágio curricular em farmácia comunitária dá oportunidade aos estudantes de pôr em prática todos os conhecimentos adquiridos. Mais que uma prova final, este permite-nos crescer profissionalmente e desenvolver os valores necessários para que nos tornemos, mais tarde, Farmacêuticos dignos, responsáveis e perfeitamente capazes.

Escolhi a Farmácia São José (FSJ), onde já tinha realizado um estágio de verão em 2016, não só pela sua dimensão e localização estratégica, que garantem, consequentemente, um movimento constante de utentes, como também pela sua organização funcional e equipa técnica, que me eram já familiares. O presente relatório de estágio apresenta-se sobre a forma de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), com vista à análise crítica da integração da aprendizagem teórica na prática profissional e adequação do plano de estudos do MICF à realidade deste estágio, na FSJ. A análise contempla os pontos fortes e os pontos fracos para a minha formação, as oportunidades concedidas e as ameaças sentidas no decorrer desta etapa.

O estágio descrito teve início a 8 de janeiro de 2018, finalizou a 18 de abril do mesmo ano, com uma duração de 670 horas, e foi orientado pelo Dr. Paulo Jorge da Silva Monteiro, Diretor Técnico da FSJ.

2. Análise SWOT

A. Pontos Fortes

A.1. Localização e horário de funcionamento alargado

A Farmácia São José (FSJ) encontra-se na Avenida Calouste Gulbenkian, em Celas, estando não só, próxima de várias unidades de saúde privadas e estabelecimentos comerciais, como também do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra (CHUC) e do Pólo Universitário das Ciências da Saúde. Apresenta-se, assim, como uma **farmácia de passagem** - para os utentes ocasionais oriundos do meio hospitalar e/ou das restantes unidades de saúde em volta - e como uma **farmácia local** - para os utentes habituais e fidelizados da zona de Celas. Para além da localização estratégica, a FSJ tem um horário de funcionamento alargado, estando aberta até às 21h durante os dias úteis e até às 20h aos sábados.

Considero a localização e o horário alargado da FSJ como pontos fortes fulcrais do meu estágio, por me terem permitido contactar com vários tipos de utentes, de diferentes faixas etárias e estratos socioeconómicos, associados a quadros clínicos distintos. Destaco, também, a vantagem de ter estagiado, esporadicamente, aos sábados e até ao encerramento diário da farmácia, pela perceção das diferenças no movimento e no tipo de utentes ao longo do dia. Desta forma, o público-alvo heterogéneo da FSJ obrigou-me a ser mais flexível no atendimento ao balcão, tendo de me adaptar, rapidamente, às diferentes realidades que iam surgindo.

A.2. Equipa Técnica

É um facto que as relações de trabalho estabelecidas entre um estagiário e a equipa que o acolhe são essenciais para a sua integração, aprendizagem e autoconfiança. No meu caso, sem dúvida que considero toda a equipa técnica da FSJ um ponto forte essencial do meu estágio. Esta é composta por um grande número de elementos que se destacam pelo seu profissionalismo, simpatia, disponibilidade, longos anos de experiência e pela dedicação incansável ao bem-estar e à melhoria da saúde dos seus utentes. Realço a organização exímia baseada na distribuição de tarefas pelos colaboradores, estando cada um associado a uma função específica, de forma a diluir o trabalho e as responsabilidades por todos. Apesar desta divisão, todos os elementos da equipa cooperam entre si e são capazes de desempenhar as funções dos colegas sempre que preciso. Desde o primeiro dia que fui incentivada a pedir ajuda, a qualquer colaborador, sempre que me deparasse com uma situação nova ou com uma que não soubesse lidar. De facto, a intervenção espontânea, por parte dos

colaboradores, em meu auxílio durante os primeiros atendimentos ao público que efetuei foi fulcral para aumentar gradualmente a minha segurança e autonomia ao balcão. Foi graças ao acompanhamento diário e à disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas que superei os obstáculos inerentes ao contacto com o público e pude evoluir na execução das minhas tarefas. Toda a equipa técnica da FSJ contribuiu, assim, para o enriquecimento da minha formação farmacêutica, colmatando algumas lacunas ao nível prático do plano de estudos do MICF.

A.3. Diversidade de produtos

De forma a fazer jus à sua dimensão, a FSJ destaca-se pela diversidade dos produtos que dispõe. Para além dos medicamentos sujeitos (MSRM) e não sujeitos a receita médica (MNSRM), esta apresenta uma vasta gama de dispositivos médicos e de produtos de dermocosmética, veterinária, fitoterapia, suplementação alimentar e nutrição desportiva. Apesar da variedade, os colaboradores têm formação contínua nas diferentes áreas, para que se mantenham atualizados e aconselhem da melhor forma os seus utentes. A aprendizagem das características, funcionamento, vantagens e desvantagens de todas estas categorias de produtos, através dos ensinamentos fornecidos pelos colaboradores responsáveis, tornou este tópico num ponto forte do meu estágio, que veio complementar as bases teóricas adquiridas durante o meu percurso académico. Penso que um farmacêutico completo deverá dominar todas estas áreas e não se restringir ao mundo dos medicamentos de uso humano (MUH).

A.4. Diversidade nas tarefas desempenhadas

A FSJ caracteriza-se por ter uma forte componente de gestão e uma atividade constante ao nível do atendimento ao público. Desta forma, esta farmácia expõe os seus estagiários ao verdadeiro ritmo de trabalho de um farmacêutico comunitário, fornecendo uma preparação prática inigualável. A passagem por todas as áreas da FSJ permitiu-me desempenhar uma série de funções distintas, que penso serem fundamentais para a minha formação prática enquanto futura farmacêutica. Assim, considero todas as tarefas por mim desempenhadas como pontos fortes do meu estágio.

Atendimento ao Público

O atendimento ao público foi, de facto, a tarefa mais difícil e enriquecedora do meu estágio. A responsabilidade do farmacêutico, que tantas vezes é o primeiro contacto dos utentes antes de uma consulta médica, enquanto agente promotor da saúde e do bem-estar



da população, intimida qualquer estagiário. Porém, de forma a diminuir a insegurança, a FSJ incentiva os seus estagiários a observarem o atendimento ao público desde muito cedo, de forma a que aprendam a lidar com este e com a imprevisibilidade das situações que surgem ao balcão. No primeiro mês, apenas efetuei atendimentos acompanhada, sendo constantemente ensinada sobre o funcionamento do Sifarma 2000[®] e alertada para os meus erros. Foi graças ao constante apoio dado pelos colaboradores que ganhei confiança na interação com os utentes e aprendi a aplicar e a interligar os meus conhecimentos teóricos de Farmacologia, Farmacoterapia, Fitoterapia, Intervenção Farmacêutica e Farmácia Clínica a casos reais, aperfeiçoando o meu aconselhamento de dia para dia. Durante o meu percurso enquanto estagiária, fiz o possível para que os meus atendimentos se regessem pelos princípios e valores farmacêuticos fornecidos pelo MICEF, apelando à adesão terapêutica e ao uso racional do medicamento. Através da interação com o público, desenvolvi várias competências, entre as quais destaco: a comunicação e o ajuste da linguagem técnica aos diferentes tipos de situação e de utentes; a destreza informática; o espírito crítico; a autonomia; e a capacidade de adaptação às várias realidades que surgiam. De todas as minhas tarefas, esta foi a que mais me fez crescer a nível pessoal e enquanto futura farmacêutica.

Gestão de encomendas e arrumação dos produtos

Na FSJ, uma das primeiras tarefas atribuídas aos estagiários consiste na receção, conferência e criação de encomendas, acompanhados pelos farmacêuticos responsáveis. Aprendi, nas primeiras semanas de estágio, os conceitos de encomenda diária - um tipo de encomenda gerida pelo Sifarma 2000[®] através do controlo dos *stocks* mínimo e máximo -, de encomenda instantânea - encomenda feita maioritariamente no momento do atendimento quando há falta de um determinado produto - e de encomendas diretas aos laboratórios. Para além destes, por ter realizado esta tarefa diariamente, acabei por me familiarizar com outros tópicos como a diferença entre o preço de venda ao público (PVP) e o preço de venda à farmácia, o impacto das margens de lucro no rendimento da farmácia, as principais empresas de distribuição farmacêutica em território nacional e o panorama dos medicamentos esgotados.

No final da receção e conferência de cada encomenda, os produtos eram arrumados nos seus locais próprios. Por exemplo, o *Robot* destina-se à maioria dos MSRM, com especial atenção aos medicamentos psicotrópicos e estupefacientes, os lineares para a maioria dos MNSRM, as gavetas de atendimento rápido para alguns MSRM e dispositivos médicos, o frigorífico para os medicamentos que requerem conservação a frio, entre outros. A

arrumação dos produtos foi essencial para memorizar os locais das diversas marcas comerciais, de forma a facilitar a sua procura aquando o atendimento.

Gestão do stock

A gestão do *stock* dos vários produtos e dos respetivos prazos de validade é essencial para que uma farmácia seja rentável. Os produtos devem apenas existir em quantidade proporcional à sua procura pelos utentes, de forma a que o investimento feito seja recompensado. No decorrer do estágio na FSJ participei, por duas vezes, em controlos periódicos do *stock*, onde efetuei a contagem física dos produtos constantes na farmácia e verifiquei a conformidade dos seus prazos de validade com os que estavam registados informaticamente. Apesar de cansativa, esta tarefa é fulcral para a deteção de erros no *stock*, e, mais uma vez, para memorizar os diversos locais de arrumação dos produtos.

Conferência do receituário

A conferência do receituário da FSJ era uma tarefa maioritariamente atribuída aos estagiários. As receitas materializadas eram recolhidas, organizadas por lotes e analisadas tendo em atenção a inclusão da denominação comum internacional (DCI) da substância ativa, dosagem, forma farmacêutica, posologia, apresentação^{2,3}, identificação do médico prescriptor e a validade da prescrição. Posteriormente, os lotes já organizados eram verificados pelo farmacêutico responsável, de forma a existir um processo de dupla verificação.

Para além da conferência diária, participei na organização mensal do receituário para efeitos de faturação. Aqui pude aprender quais os passos a cumprir antes de o enviar, até ao dia 5 de cada mês, ao Centro de Conferência de Faturas (CCF) (as receitas eletrónicas são automaticamente enviadas) e como funciona a faturação por parte dos organismos de comparticipação complementares ao Sistema Nacional de Saúde (SNS). A participação nestas duas atividades permitiu-me contactar com uma realidade mais burocrática, e tão importante, que não nos é mostrada durante o percurso académico. Esta aprendizagem tornou-me mais sensível na análise e validação das prescrições médicas apresentadas pelos utentes, durante o atendimento ao público.

Preparação de medicamentos manipulados

É um facto que os avanços científicos no âmbito da tecnologia farmacêutica convergem na criação de novas fórmulas farmacêuticas, o que, naturalmente, diminui a atual procura e preparação de medicamentos manipulados. No entanto, para casos de ajuste posológico em

formulações de uso pediátrico, preparações não existentes no mercado e patologias específicas que requeiram uma terapêutica personalizada, a preparação de medicamentos manipulados continua a ser uma realidade. A FSJ prepara medicamentos manipulados regularmente, possuindo instalações e equipamentos adequados, matérias-primas devidamente arrumadas e identificadas, documentos oficiais e obrigatórios - como o boletim de análise e a ficha de segurança de cada substância ativa - e o programa informático *SoftGaleno*. Destaco a utilidade do *SoftGaleno* na preparação dos medicamentos manipulados e na gestão do *stock* das substâncias ativas e excipientes.

Considero a minha participação na preparação de alguns medicamentos manipulados um importante ponto forte do meu estágio, por me ter permitido pôr em prática os conhecimentos teóricos e laboratoriais adquiridos em Farmácia Galénica. Realço a preparação de uma solução de **Álcool a 70% Boricado à saturação** - cuja ficha de preparação se encontra no Anexo I - usada devido ao seu efeito antisséptico e desinfetante⁴ para o tratamento de uma otite externa, e de uma **Suspensão Oral de Trimetoprim** (Anexo II) - um antibiótico inibidor reversível da di-hidrofolato redutase⁵ com atividade em bactérias de Gram negativo - para o tratamento de uma infeção urinária infantil.

A.5. Serviços diferenciados

A FSJ é uma farmácia que, acima de tudo, visa o bem-estar e a preservação da saúde dos seus utentes. Como tal, dispõe de um conjunto amplo de serviços diferenciados como a administração de medicamentos injetáveis e de vacinas não incluídas no Programa Nacional de Vacinação (PNV), a determinação de parâmetros bioquímicos e fisiológicos (colesterol total, glicémia e pressão arterial) e as consultas de revisão da medicação, de podologia, de nutricionismo e de nutrição desportiva. Entre os serviços nomeados, fui responsável, várias vezes, pela medição da pressão arterial e da glicémia. Encaro este tópico com um ponto forte do meu estágio, por me ter confrontado com situações reais onde pude aplicar os meus conhecimentos relativamente à realização das medições e análise dos resultados, e por me ter possibilitado dialogar em privado com os utentes, fora da agitação do balcão. Esta interação mais tranquila permitiu-me esclarecer-lhes as dúvidas que tinham sobre as suas patologias e sensibilizá-los para a adoção de hábitos e estilos de vida mais saudáveis.

A.6. Importância do Robot e do Cash Guard

A FSJ tem a vantagem de possuir duas tecnologias que aumentam exponencialmente o seu rendimento - um *Robot* do modelo *Rowa* e o sistema *Cash Guard*. O *Robot* está ligado ao Sifarma 2000[®] e permite o armazenamento de um grande volume de medicamentos, cuja



entrada é dada manualmente, que são arrumados consoante o princípio *first-in, first-out* (prioridade de saída aos medicamentos com um prazo de validade mais curto). Para além de rentabilizar o espaço físico da farmácia e permitir o controlo dos prazos de validade e do *stock* real dos medicamentos, o robot tem, sobretudo, impacto no ato da dispensa ao público pois, ao fornecer os produtos pedidos de forma automática, minimiza os erros de troca de medicamentos e/ou dosagens. Assim, o *Robot*, para além de garantir uma correta dispensa da medicação e mais tempo de aconselhamento aos utentes no atendimento, permite, aquando a introdução manual dos medicamentos, a aprendizagem das várias marcas comerciais e respetivas substâncias ativas. Por estas razões, considero-o um ponto forte do meu estágio.

Já o *Cash Guard*, armazena o lucro monetário gerado pelas vendas da FSJ, registando todos os movimentos efetuados por cada colaborador. Cito esta tecnologia como um ponto forte por agilizar o meu atendimento ao público, no que toca à devolução de trocos aos utentes, e facilitar o cálculo da minha caixa ao fim de cada dia de trabalho.

A.7. Dinamização e gestão do espaço físico da farmácia

Todos os colaboradores da FSJ, para além de excelentes profissionais de saúde, apresentam-se como pessoas inovadoras sempre preocupadas com a atualização da farmácia, face ao mercado e à concorrência. O seu objetivo consiste em criar um espaço acolhedor e cativante, capaz de satisfazer as necessidades dos seus utentes. A disposição dos produtos, nos lineares e nas gôndolas, as publicitações na rede social *Facebook* e a própria decoração da farmácia eram renovadas regularmente, tendo sempre em conta a sazonalidade das patologias mais frequentes, as campanhas promocionais das várias marcas e as datas comemorativas. Considero a forte dinamização da FSJ um ponto forte do meu estágio, por me demonstrar as aplicações práticas dos conhecimentos adquiridos nas aulas de Organização e Gestão Farmacêutica e Comunicação e Marketing Farmacêutico, nomeadamente ao nível da arrumação dos produtos nas gôndolas e nos lineares, para os tornar em zonas quentes ou zonas frias, consoante a intenção.

B. Pontos Fracos

B.1. Componente prática do MIFC

Considero o ato da dispensa e a interação com o público como os maiores desafios do meu estágio em farmácia comunitária, não só pela sua imprevisibilidade, como também pela falta de bases que senti em determinadas áreas. É um facto que um MIFC possui um plano de

estudos diversificado e abrangente, com uma forte componente teórica, desenhado para formar profissionais versáteis e aptos para ingressar em qualquer área do mundo farmacêutico. Porém, apesar da melhoria significativa no seu último programa curricular com a inclusão de novos temas (como as afeções bucodentárias e oftalmológicas) e de um maior aprofundamento no aconselhamento dermofarmacêutico e cosmético, continuam a existir lacunas, na parte prática, que devem ser colmatadas. A título de exemplo, realço a incapacidade que senti no aconselhamento aos utentes nas áreas de veterinária e dispositivos médicos, tendo de recorrer ao apoio e sabedoria da equipa técnica. Começando pela área da veterinária, penso que a sua abordagem durante o curso não está, de todo, em conformidade com a realidade prática do farmacêutico comunitário. Já a área dos dispositivos médicos, apenas é incluída numa unidade curricular opcional, o que contradiz a sua importância diária (tratamento de feridas, ortopedia, aparelhos de medição...) e o seu peso numa farmácia comunitária.

B.2. Plano de estágio

Penso que um aspeto menos positivo do meu estágio foi a ausência de um plano de estágio fixo, que orientasse a execução das minhas tarefas nas primeiras semanas. A azáfama e o elevado fluxo de utentes que caracterizam a FSJ tornam, muitas vezes, difícil a planificação das tarefas a atribuir aos estagiários. Os estagiários são também incentivados a observarem o movimento do balcão desde muito cedo, o que, apesar de nos mostrar desde logo a realidade profissional de um farmacêutico comunitário, provoca uma certa desmotivação, por não estarmos ainda preparados para exercer o ato da dispensa ao público.

Porém, com a ajuda constante e disponibilidade de toda a equipa técnica da FSJ, este ponto fraco acabou por não ter grande impacto.

C. Oportunidades

C.1. Sifarma 2000®

Sifarma 2000®, desenhado pela Glintt, é o *software* de gestão e atendimento farmacêutico mais utilizado nas farmácias portuguesas⁶. Este programa, para além de executar os passos básicos do ato da dispensa ao público, permite controlar os *stocks* e os prazos de validade de todos os produtos, gerar e rececionar encomendas diárias e instantâneas e analisar o histórico de compras e vendas de todos os produtos constantes na farmácia. O Sifarma 2000® é também dotado de uma forte componente científica, conferida pelo Centro de

Informação do Medicamento (CEDIME) pertencente à Associação Nacional das Farmácias Portuguesas (ANF), contendo informações acerca das indicações terapêuticas, da classificação farmacoterapêutica das substâncias ativas, da posologia, dos cuidados a ter e de possíveis interações medicamentosas entre os demais medicamentos. Foi, na verdade, graças a esta ferramenta de ensino, que ultrapassei as dificuldades que tive em associar as marcas comerciais às substâncias ativas, nas primeiras semanas do estágio. Para mim, saber trabalhar neste *software* é uma mais-valia no ingresso ao mercado de trabalho farmacêutico, sobretudo quando este é *software* que mais prevalece nas farmácias portuguesas.

C.2. Prescrição por Receita Eletrónica desmaterializada

A introdução da nova receita eletrónica desmaterializada, através do Despacho n.º 2935-B/2016 de 25 de fevereiro de 2016⁷, constituiu um avanço imensurável na área da saúde em Portugal. Para os profissionais de saúde (médicos prescritores e farmacêuticos), a informatização total permite a prescrição simultânea de diferentes tipologias de medicamentos⁸, uma maior rapidez, eficácia e segurança no ato da dispensa, por diminuir os erros inerentes à interpretação das receitas manuais, controlar automaticamente os prazos de validade e agilizar o processo de conferência do receituário. No caso dos utentes, estes podem adquirir apenas a quantidade e os medicamentos que pretendem, em qualquer farmácia, ficando sempre com a anotação do número de embalagens restantes na Guia de Tratamento⁸. Apesar da receita sem papel ser obrigatória para todas as entidades do SNS desde o dia 1 de abril de 2016⁸, continua a haver uma quantidade considerável de prescrições materializadas. Porém, posso afirmar que durante o meu período de estágio, a maioria dos atendimentos que efetuei foram através de receitas desmaterializadas, o que demonstra o bom caminho desta inovação. O contacto com este sistema traduziu-se numa oportunidade de aprendizagem e de preparação para um futuro onde predominará a utilização dos meios eletrónicos, ao nível dos serviços do SNS.

C.3. Filosofia Kaizen

Kaizen é uma filosofia de origem oriental que defende a melhoria contínua das organizações através do envolvimento de todos os seus membros⁹. Há dois anos que a FSJ segue esta política através da implementação das suas medidas, como por exemplo, a identificação do conteúdo de todas as gavetas e armários e a discriminação das zonas para a receção de encomendas. Para além das medidas práticas, o Kaizen apela à realização regular de reuniões breves de equipa, nas quais participei, para que todos os colaboradores possam discutir ideias e dar a sua opinião sobre o funcionamento da farmácia.

Assim, o contacto com a filosofia Kaizen evidenciou-se como uma oportunidade para entender melhor os seus princípios e o impacto positivo que a execução destes pode ter ao nível da produtividade, motivação e organização de uma equipa técnica.

C.4. Programa Valormed

A Valormed - uma sociedade sem fins lucrativos tutelada pela Agência Portuguesa do Ambiente (APA) - visa a gestão dos resíduos de MUH e produtos veterinários e das respetivas embalagens, através da sua recolha nas farmácias comunitárias¹⁰. Ao estagiar na FSJ tive a oportunidade de contactar e promover este sistema junto dos utentes, sensibilizando-os para o uso racional do medicamento e para a importância da sustentabilidade nas etapas finais do seu ciclo de vida. Realço, com grande satisfação, o número elevado de utentes que me entregaram este tipo de resíduos, perfeitamente consciencializados dos seus atos. Durante o meu estágio, tive também possibilidade de participar numa campanha da Valormed - os “Novos ECOMED” - à qual a FSJ aderiu. Os ECOMED são caixas de cartão de tamanho inferior a serem entregues aos utentes como ecopontos para recolha dos seus resíduos domésticos de medicamentos¹¹. Uma vez cheios, os ecopontos eram entregues na farmácia e sofriam o mesmo tratamento que o anteriores¹¹. A meu ver, a adesão a este tipo de iniciativas reforça o papel do farmacêutico, enquanto agente de saúde pública, na preservação e promoção da saúde ambiental¹.

C.5. Formação Contínua

A formação contínua dos elementos de uma equipa técnica é essencial para se manterem atualizados face à inclusão permanente de novos produtos no mercado. Durante o meu estágio na FSJ tive oportunidade de assistir a várias formações internas, facultadas pelos delegados de informação de diferentes laboratórios, principalmente nas áreas de dermocosmética, suplementação alimentar, higiene oral, contraceção de emergência e dispositivos médicos para o tratamento de feridas. As formações eram de curta duração e apresentavam as vantagens, indicações terapêuticas e técnicas de venda para os produtos comercializados, ou prestes a serem lançados, de cada marca. De facto, estas assumem-se como uma ferramenta de suporte ao aconselhamento dos utentes, não só pelo seu carácter informativo, como também por permitirem o esclarecimento de dúvidas por parte dos colaboradores. Para além destas, participei, também, em algumas formações externas, em que destaco duas - uma sobre toda a gama de fotoproteção da Isdin[®] e outra sobre a psoríase promovendo o medicamento Enstilar[®] da LEO Pharma - que, para mim, foram as mais pertinentes. Quer as formações internas, quer as externas, contribuíram para a

aquisição de novos conhecimentos que poderão influenciar a entrada no mercado de trabalho.

D. Ameaças

D.1. Impacto da venda de MNSRM e dispositivos médicos fora da farmácia

Desde a legalização da venda de MNSRM fora das farmácias, pelo Decreto-Lei n.º 134/2005 de 16 de Agosto¹², que o número destes locais de venda se multiplica, principalmente nas grandes superfícies. Esta realidade é, inevitavelmente, uma ameaça à profissão farmacêutica, quer por motivos económicos, quer pela desvalorização e banalização do conceito de medicamento. Relativamente ao peso deste tópico sobre o meu estágio, devo confessar que não consegui concluir um número considerável de atendimentos pela preferência dos utentes em adquirir os produtos (MNSRM e certos dispositivos médicos) em locais que tivessem um preço mais acessível. É um facto que as grandes superfícies conseguem um preço de venda ao público mais inferior, devido ao elevado volume de compras que efetuam. Para além do impacto na viabilidade económica das farmácias, os locais de venda de MNSRM apelam, perigosamente, a uma auto-medicação irresponsável por parte dos utentes que, sem qualquer tipo de aconselhamento farmacêutico, pensam que sabem o que é melhor para a sua saúde. Na minha opinião, deveria haver, num futuro próximo, um maior investimento na prestação de certos serviços farmacêuticos, como as consultas de revisão de medicação e de acompanhamento farmacoterapêutico, de forma a evidenciar-se o carácter insubstituível do farmacêutico.

D.2. Medicamentos esgotados

Foram várias as ocasiões em que fui confrontada com o desagrado e frustração dos utentes, perante a impossibilidade de lhes ceder os medicamentos prescritos, por estarem esgotados. A realidade dos medicamentos esgotados é cada vez mais frequente graças à legalidade do *parallel trading*¹³.

Recordo, entre outros, o caso marcante do medicamento Ezetrol® 10 mg, contendo a substância ativa ezetimiba, indicado para o tratamento da hipercolesterolemia em coadjuvação com as estatinas, de forma a reduzir o risco de eventos cardiovasculares em doentes propensos a tal¹⁴. O carácter crónico da toma deste medicamento aliado à falta constante deste em *stock*, por estar esgotado, provocava ansiedade e preocupação nos utentes e, conseqüentemente, em toda a equipa técnica. Os colaboradores responsáveis pela gestão e receção das encomendas de tudo faziam para repor os *stocks*, tentando dispensar



de forma justa o número reduzido de embalagens que era fornecido de quando em quando pelo laboratório. Logicamente que este tópico se assumiu como uma ameaça ao meu estágio, sobretudo no ato da dispensa, por me impedir de satisfazer as necessidades dos utentes.

D.3. Falta de credibilidade nos Medicamentos Genéricos

Desde a implementação da obrigatoriedade da prescrição por DCI^{2,3}, que os utentes podem optar por adquirir medicamentos genéricos ou medicamentos de marca, devendo ser sempre questionados, pelo farmacêutico, pela sua preferência durante o ato da dispensa. Contudo, embora na definição de medicamento genérico, pelo Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de Agosto¹⁵, esteja descrito que estes têm a “mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias ativas, a mesma forma farmacêutica”, demonstrando a sua bioequivalência com o medicamento de referência através de estudos de biodisponibilidade, a população continua desconfiada relativamente à sua qualidade e eficácia. Considero este tópico uma ameaça ao meu estágio pela dificuldade que senti em dispensar medicamentos genéricos, principalmente a utentes mais idosos em situações de antibioterapia, antidepressivos e medicamentos oculares. Realço até, uma situação mais grave, em que o utente se recusou a adquirir a medicação crónica por indisponibilidade das marcas de referência, mesmo eu tendo assegurado que as marcas genéricas eram confiáveis e eficazes. Este assunto requer, indubitavelmente, uma maior atenção por parte do corpo farmacêutico, para que se promova o conhecimento e desmistifiquem os falsos receios relativamente a esta classe de medicamentos.

3. Aplicação de Conhecimentos - Casos Clínicos

O estágio curricular em farmácia comunitária é o teste final aos conhecimentos adquiridos ao longo dos quatro anos e meio de ensino do MICEF. Apesar de toda a insegurança inicial, é da nossa responsabilidade, enquanto futuros profissionais de saúde, garantir que os utentes ficam esclarecidos acerca da medicação que lhes dispensamos, quer ao nível do mecanismo de ação dos fármacos e dos possíveis efeitos secundários, quer ao nível da sua posologia e particularidades na toma, apelando sempre à adesão terapêutica e à prática de medidas não farmacológicas. Apresento, neste relatório, três exemplos de casos reais, com os quais me deparei frequentemente, que espelham a importância do aconselhamento farmacêutico.



Caso I

Uma utente do sexo feminino, com cerca de 30 anos, dirige-se à farmácia com queixas de ardor e prurido na região genital associadas a um corrimento vaginal esbranquiçado sem odor. Após exposição da sintomatologia, questionei a utente se sentia, adicionalmente, algum desconforto a nível urinário, tendo obtido uma resposta negativa. Expliquei-lhe, depois de confirmação farmacêutica, que a sintomatologia poderia estar associada a uma infeção fúngica vaginal (candidíase vaginal), infeção esta relativamente frequente e geralmente causada pelo fungo oportunista da flora vaginal *Candida albicans*¹⁶. Aconselhei o MNSRM Gino-Canesten[®], um creme vaginal contendo 10 mg/g de clotrimazol (antifúngico) para aplicar uma vez por dia à noite, durante seis dias¹⁷. Realcei que se os sintomas não melhorassem, deveria consultar um médico especialista.

Caso II

Uma utente idosa apresenta-se na farmácia com sintomatologia indicativa de uma infeção urinária. Após questionada, a utente revela que as infeções são recorrentes e que tinha acabado de recuperar de uma, com toma de antibiótico recomendado pelo médico. Queixava-se de vontade frequente súbita e imediata em urinar, sem estar associada a dores. Claramente percebendo a vontade da utente em evitar uma nova infeção, aconselhei o dispositivo médico Roter Cystiberry[®], contendo 500 mg de extrato patenteado CranberryActive[™] (Arando Americano), indicado para a prevenção das infeções urinárias, com a toma diária de uma cápsula, durante um mês¹⁸. O principal mecanismo de ação do arando consiste em inibir a adesão e a consequente formação de biofilmes pela bactéria *Escherichia coli* no epitélio urinário, o que impede a génese da infeção¹⁹. Contudo, alertei a doente de que o produto não seria eficaz no caso de ser uma infeção já instalada, uma vez que o arando não demonstra eficácia na remoção de biofilmes já formados. Reforcei que, caso a sintomatologia permanecesse e/ou piorasse, deveria consultar novamente um médico.

Caso III

Um utente do sexo masculino, cerca de 40 anos, dirigiu-se à farmácia, em estado apressado, queixando-se de desconforto abdominal e diarreia que durava há já uns dias. Solicita-me uma solução com urgência para a sua situação, apresentando motivos profissionais. Apesar da toma de fármacos antidiarreicos ser, numa primeira abordagem, desaconselhada, questionei o utente relativamente a outros sinais como febre, vômitos, dores de estômago e presença de sangue e/ou pus nas fezes. Após garantir que a resposta era negativa para todas as questões, dispensei, com autorização de um farmacêutico, uma



embalagem do MNSRM, Imodium Rapid[®], contendo comprimidos orodispersíveis com 2 mg de loperamida - um agente obstipante que diminui o peristaltismo propulsivo, aumentando o tempo de trânsito intestinal e a reabsorção de água²⁰. Esclareci a posologia e as particularidades da toma, explicando que deveria tomar, desde logo, 2 comprimidos, seguidos de 1 comprimido após cada dejeção diarreica²⁰. Alertei para uma dose máxima diária de 4 comprimidos e uma duração máxima de tratamento de 48 horas.²⁰ Dei ênfase às medidas não farmacológicas de hidratação e reposição regular de eletrólitos, recomendando para tal o suplemento alimentar probiótico Atyflor[®], com uma toma diária durante uma refeição, de forma a reestabelecer a flora intestinal.

4. Conclusão

Não foi com surpresa que percebi, durante o meu estágio curricular, que as funções desempenhadas pelos farmacêuticos têm um elevado peso na sociedade. A confiança depositada pelos utentes na farmácia, enquanto espaço de resolução de problemas de saúde, é o principal ponto de motivação para a constante atualização técnica e científica, de forma a satisfazer todas as suas necessidades da melhor forma. Depois desta experiência, acredito que um farmacêutico competente se deve considerar um eterno estudante, procurando sempre renovar o seu conhecimento farmacológico, regulamentar e comercial.

O estágio curricular assume-se como a exposição prática, no seio de uma equipa multidisciplinar e em ambiente profissional, de todos os conhecimentos técnicos e científicos adquiridos ao longo do percurso académico. É a experiência, em primeira mão, do que é ser farmacêutico, incluindo as dificuldades, a banalização do conceito de medicamento, a desvalorização da profissão, a dependência dos utentes e a gratidão dos pequenos gestos. Mais que qualquer outra unidade curricular, considero este estágio como uma das melhores ferramentas de ensino prático e defendo a sua inclusão nos restantes anos do MICF.

O acompanhamento diário, que obtive na FSJ, permitiu-me desenvolver competências ao nível da comunicação, autonomia, gestão de tempo, trabalho de equipa, empatia, entre outras, que considero essenciais à atividade farmacêutica competente. Como tal, devo o sucesso deste estágio a toda a equipa técnica, cujo constante apoio e disponibilidade para a partilha de conhecimentos farão sempre parte da minha formação enquanto futura farmacêutica.

Para terminar, realço o carácter indispensável da formação contínua, do rigor científico no ato do aconselhamento e de um contacto regular com os médicos prescritores no combate à desvalorização da profissão farmacêutica, que se torna, cada vez mais, numa realidade.

5. Bibliografia

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos**. [Acedido a 25 de abril de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/a-ordem-dos-farmaceuticos/regulamentos/>
2. Lei n.º 11/2012 de 8 de Março de 2012 do Ministério da Saúde, Diário da República, 1ª Série, n.º 49 de 08 de Março de 2012.
3. Portaria n.º 137-A/2012 de 11 de Maio de 2012 do Ministério da Saúde, Diário da República, 1ª Série, 1º Suplemento de 11 de Maio de 2012.
4. DRUGS.COM - **Boric Acid**. [Acedido a 17 de abril de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.drugs.com/search.php?searchterm=boric+acid>
5. DRUGS.COM - **Trimethopirm**. [Acedido a 17 de abril de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.drugs.com/monograph/trimethoprim.html>
6. GLINTT - **SIFARMA – Desenvolvido por e para Farmacêuticos. 90% das Farmácias em Portugal usam o SIFARMA**. [Acedido a 23 de abril de 2018]. Disponível em: <http://www.glintt.com/pt/o-que-fazemos/ofertas/SoftwareSolutions/Paginas/Sifarma.aspx>
7. Despacho n.º 2935-B/2016 de 2 de fevereiro de 2016 do Ministério da Saúde, Diário da República, 1ª Série, 1º Suplemento, n.º39 de 2 de fevereiro de 2016.
8. SPMS - SERVIÇOS PARTILHADOS DO MINISTÉRIO DA SAÚDE – **Receita sem Papel**. [Acedido a 23 de abril de 2018]. Disponível na Internet: <http://spms.minsaude.pt/product/receita-sem-papel/>
9. KAIZEN INSTITUTE - **Significado de Kaizen**. [Acedido a 24 de abril de 2018]. Disponível na Internet: <https://pt.kaizen.com/quem-somos/significado-de-kaizen.html>
10. VALORMED - **Quem somos**. [Acedido a 24 de abril de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.valormed.pt/paginas/2/quem-somos/>
11. VALORMED - **Novos ECOMED**. [Acedido a 24 de abril de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.valormed.pt/article/view/135/novos-ecomed>
12. Decreto-Lei n.º 134/2005 de 16 de Agosto de 2005 do Ministério da Saúde, Diário da República, 1ª Série, n.º 156 de 16 de Agosto de 2005.
13. SILVEIRA, J. - **A verdade sobre os medicamentos “esgotados”**. Público, 51453 (2012), 52.
14. INFARMED, I.P. - **Resumo das Características do Medicamento Ezetrol® 10 mg, Comprimidos**. [Acedido a 25 de abril de 2018] Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=35024&tipo_doc=rcm

15. Decreto-Lei n.º 176/2006 de 30 de Agosto de 2006 do Ministério da Saúde, Diário da República, 1ª Série, n.º 167 de 30 de Agosto de 2006.
16. BITEW, A., ABEBAW, Y. - **Vulvovaginal candidiasis: species distribution of *Candida* and their antifungal susceptibility pattern.** *BMC Women's Health*. 18:94 (2018) 1-10.
17. INFARMED, I.P. - **Resumo das Características do Medicamento Gino-Canesten® 10 mg/g, Creme vaginal.** [Acedido a 30 de abril de 2018] Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=3916&tipo_doc=rcm
18. ROTER - **Roter Cystiberry®.** [Acedido a 30 de abril de 2018] Disponível na Internet: <https://www.roter.pt/nl/roter-cystiberry%C2%AE>
19. GUAY, D. R. P. - **Cranberry and Urinary Tract Infections.** *Drugs*. 69 (2009) 775-807.
20. INFARMED, I.P. - **Resumo das Características do Medicamento Imodium Rapid® 2 mg, Comprimidos Orodispersíveis.** [Acedido a 30 de abril de 2018] Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=4444&tipo_doc=rcm



6. Anexos

Anexo I

Ficha de Preparação do Medicamento Manipulado: Álcool a 70% Boricado à saturação

FARMÁCIA S. JOSÉ

Ficha de Preparação do Manipulado
Álcool 70% Boricado à saturação

Cliente: [Redacted]

Forma Farmacêutica: SOLUÇÃO

Data de Preparação: 09/04/2018 Prazo Validade: 09/05/2018

Nº Lote: 9.IV.18 Registo Copiador: 1.578

Condições de Conservação:

Posologia:

Qtd. Total Medicamento: 1 X 30,00 ml

Director Técnico: Dr. Paulo Monteiro

Operador: Dra. Andreia Madanelo

Médico:

Honorários: 4,98 €	Valor Net: 21,74 €	Valor PVP 23,04 €
Factor Multiplicativo: 3,00	Valor IVA: 1,30 €	
	Valor Total: 23,04 €	

Matérias Primas	Usar	Nº Lote	Origem	Qtd. Usada	Unid	Preço Aq. s/ IVA	Factor Multiplic.	Preço Mat.prima
Ácido Bórico		151402-O-	Acofarma	1,50	g	0,01 €	2,20	0,04 €
Subtotal								0,04 €

Produto	Cod de Iva	% Iva	P.V.P	Preço
Álcool a 70 %	NOR	23,00	0,75 €	0,61 €

Preparação

Verificar o estado de limpeza do material a utilizar.

Colocar em proveta rolhada uma quantidade de álcool a 70% correspondente a cerca de 3/4 da quantidade total de solução a preparar.

Pesar o ácido bórico e adicionar, aos poucos, ao álcool a 70%, agitando fortemente durante 20 seg após cada adição.

Após a adição de todo o ácido bórico, completar o volume com álcool a 70% e agitar durante 20 seg.

Deixar a proveta em repouso durante uma hora, agitando-a, durante 20 seg, de 15 em 15 min.

Filtrar a solução.

Limpar e arrumar o laboratório.

Aparelhagem

Balança electrónica

Proveta

Espátula

Embalagem	Tipo	Nº Lote	Fornecedor	Capac	Qtd	Preço	Fact. Mult.	Valor Net
Frasco Conta-Gotas Vidro	EMBAL		Plural	30 mL	1,00	1,06 €	1,20	1,27 €
Subtot								1,27 €

Ensaio	Especificação	Conforme	Utilizador	Assinatura
Cor	Incolor	<input checked="" type="checkbox"/>		
Odor	Alcoólico	<input checked="" type="checkbox"/>		
Aspecto	Homogéneo	<input checked="" type="checkbox"/>		
Quantidade	30 mL +/- 5%	<input checked="" type="checkbox"/>		

9/4/18
(Data)

[Assinatura]
(Assinatura)



Anexo II

Imagem e parte da Ficha de Preparação do Medicamento Manipulado: Suspensão Oral de Trimetoprim

FARMÁCIA S. JOSÉ
Farmácia
São José

Ficha de Preparação do Manipulado
Suspensão Oral de Trimetoprim a 1%

Cliente: [Redacted]

Forma Farmacéutica: SUSPENSÃO

Data de Preparação: 18/04/2018 Prazo Validade: 18/05/2018

Nº Lote: 18.IV.18 Registo Copiador: 1.587

Condições de Conservação: Conservar entre 2º e 8ºC

Posologia:

Qtd. Total Medicamento: 1 X 35,00 ml

Director Técnico: Dr. Paulo Monteiro

Operador: Dra. Andreia Madanelo

Médico: Dra Claudia Arriaga

Honorários:	4,98 €	Valor Net:	31,34 €	Valor PVP 33,22 €
Factor Multiplicativo:	4,50	Valor IVA:	1,88 €	
		Valor Total:	33,22 €	

Matérias Primas	Usar	Nº Lote	Origem	Qtd. Usada	Unid	Preço Aq. s/ IVA	Factor Multiplic.	Preço Mat.prima
Trimetoprim		161017-J-	Acofarma	0,35	g	0,11 €	2,50	0,09 €
Xarope simples, BP2000 (F		171514-p-	Acofarma	34,62	ml	0,01 €	1,90	0,72 €
Essência de Banana (Platan		161007-J-	Acofarma	0,03	ml	0,09 €	2,80	0,01 €
Subtotal								0,82 €

Preparação

Verificar o estado de limpeza do material a utilizar.

Preparação de 10ml de solução aquosa de essência de banana a 10% (m/v).

Pesar a essência hidrossolúvel de banana e transferir para proveta rolhada, lavando o recipiente de pesagem com água purificada.

Adicionar cerca de 5 ml de água purificada e agitar até obtenção de uma solução coloidal de aspecto homogéneo. Completar o volume com água purificada.

Agitar até obtenção de uma solução coloidal com aspecto homogéneo.

Pesar o trimetoprim e transferir para almofariz de porcelana.

Adicionar aos poucos cerca de 10 ml de xarope simples e misturar.

Transferir a suspensão para proveta rolhada.

Lavar o almofariz com xarope e juntar à proveta.

Adicionar a solução aquosa de essência de banana a 10% (m/v).

Completar o volume com xarope.

Agitar manualmente até à obtenção de uma suspensão com aspecto homogéneo.

Lavar e secar o material utilizado.

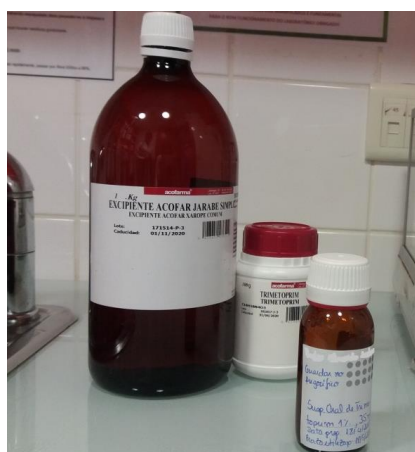
Aparelhagem

Espátula

Proveta

Balança electrónica

Embalagem	Tipo	Nº Lote	Fornecedor	Capac	Qtd	Preço	Fact. Mult.	Valor Net
Frasco de Vidro 60 mL	EMBAL	140441-X-1	Acofarma	60 mL	1,00	0,73 €	1,20	0,88 €
Subtot								0,88 €



Recipiente em vidro âmbar fechado e rotulado contendo a suspensão oral de Trimetoprim.

Os recipientes atrás contêm o excipiente xarope simples (à esquerda) e a substância ativa (à direita).

Parte II

Relatório de Estágio em Assuntos Regulamentares do Medicamento na
Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P.

Lista de Abreviaturas

AIM - Autorização para Introdução no Mercado

ATC - *Anatomical Therapeutic Chemical Code*

CAM - Comissão de Avaliação de Medicamentos

CESP - *Common European Submission Portal*

CMDh - *Co-ordination Group for Mutual Recognition and Decentralised Procedures*

CTS - *Communication and Tracking System*

DAM - Direção de Avaliação de Medicamentos

DCP - Procedimento Descentralizado

DRHFP - Direção de Recursos Humanos, Financeiros e Patrimoniais

EME - Estado Membro Envolvido

EMR - Estado Membro de Referência

FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

GestProc - Base de dados de Gestão de Processos

GIMED - Base de dados de Gestão de Informação de Medicamentos

GPRen - Base de dados de Gestão de Processos de Renovação

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

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MUH - Medicamentos de Uso Humano

OMS - Organização Mundial de Saúde

PRM - Procedimento de Reconhecimento Mútuo

SMUH-ALTER - Plataforma de Submissão de Pedidos de Alteração do Sistema de Gestão de Medicamentos de Uso Humano

SWOT - *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

UAC - Unidade de Avaliação Científica

UEC - Unidade de Ensaio Clínicos

UIM - Unidade de Introdução no Mercado

UMM - Unidade de Manutenção no Mercado

I. Introdução

A Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) possibilita aos alunos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) a realização de um segundo estágio curricular, além do estágio obrigatório em Farmácia Comunitária, numa outra área farmacêutica - Farmácia Hospitalar, Indústria, Distribuição, Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. (INFARMED, I.P.) e Ordem dos Farmacêuticos - consoante os seus interesses pessoais. A meu ver, esta é uma oportunidade valiosa que permite o contacto com outras realidades profissionais, reforçando o papel do Farmacêutico enquanto especialista do medicamento e, como tal, a sua presença necessária em todas as etapas do seu ciclo de vida. Desde muito cedo que defini que o meu segundo estágio seria na Direção de Avaliação do Medicamento, no INFARMED, I.P., não só pela relevância da área dos Assuntos Regulamentares ao nível do mercado farmacêutico global, como também pela possibilidade de estagiar numa das melhores agências regulamentares a nível europeu e, consequentemente, de adquirir novos conhecimentos e competências nesta área.

Desta forma, o presente relatório apresenta-se sobre a forma de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), com vista à análise crítica da integração da aprendizagem teórica, na área dos assuntos regulamentares, à realidade profissional deste estágio, no INFARMED, I.P.. A análise contempla os pontos fortes e os pontos fracos para a minha formação, as oportunidades concedidas e as ameaças sentidas no decorrer desta etapa. O estágio descrito teve início a 2 de maio de 2018 e finalizou a 31 de julho do mesmo ano, sob orientação da Dr^a. Dina Cordeiro Lopes.

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

Encontra-se no Parque de Saúde de Lisboa localizada a sede da Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P., adiante designada por Infarmed. O Infarmed constitui o instituto público português responsável pela regulação e supervisão da qualidade, segurança e eficácia dos setores respeitantes aos medicamentos, dispositivos médicos e produtos cosméticos, e pela garantia do acesso aos mesmos por parte dos profissionais de saúde e dos cidadãos¹. Encontra-se integrado na administração indireta do Estado Português, sob a tutela do Ministro da Saúde, tendo património próprio e autonomia administrativa e financeira^{1,2}. Devido à ligação estatal, encontra-se dependente das decisões políticas, nomeadamente, as que dizem respeito à comparticipação dos medicamentos. Em termos de organização, o Infarmed divide-se em cinco Órgãos e em doze Unidades Orgânicas, como se



apresenta na figura I, agrupadas consoante desempenhem funções de suporte ou de negócio³.

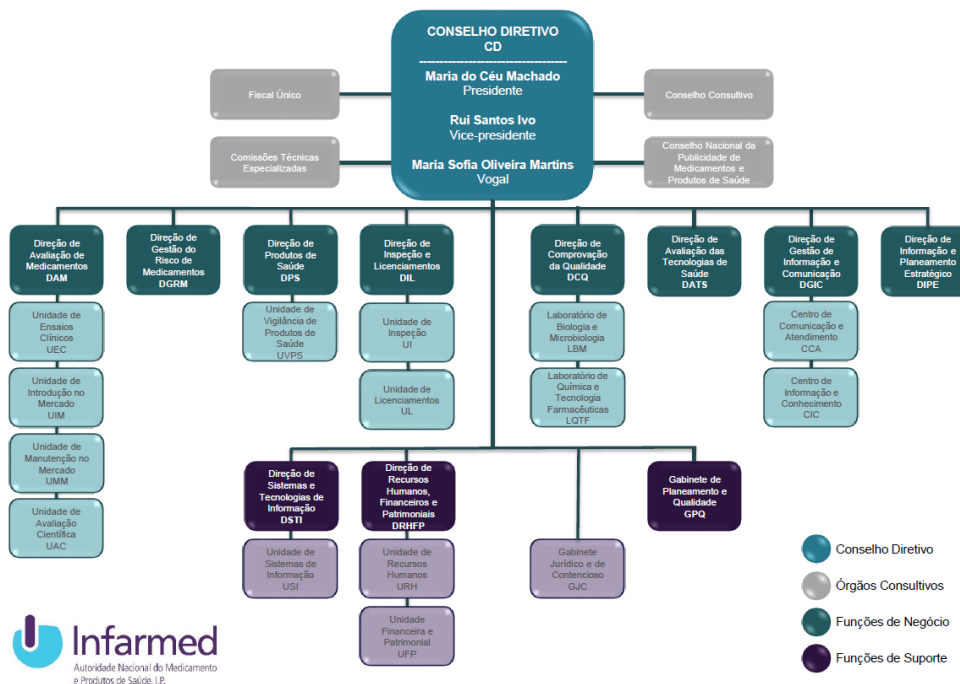


Figura I - Organograma do INFARMED, I.P.

Disponível na Internet <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/estrutura-e-organizacao>. [Acedido a 18 de julho de 2018].

2.1. Direção de Avaliação de Medicamentos – Unidade de Manutenção no Mercado

A Direção de Avaliação de Medicamentos (DAM) está incluída na lista das unidades orgânicas com funções de negócio e é constituída por quatro unidades - a Unidade de Ensaios Clínicos (UEC), a Unidade de Introdução no Mercado (UIM), a Unidade de Avaliação Científica (UAC) e a Unidade de Manutenção no Mercado (UMM)⁴, onde realizei o meu estágio. De forma resumida, a UMM atua na fase posterior à concessão de Autorização para Introdução no Mercado (AIM), responsabilizando-se pela gestão de processos de Renovações e Alterações necessários à manutenção no mercado dos medicamentos de uso humano (MUH) já autorizados⁴. Dentro da UMM existem várias equipas divididas consoante o tipo de procedimento dos processos e a posição que Portugal ocupa enquanto estado membro europeu. No meu caso fiquei integrada na equipa responsável pela gestão de processos europeus, de procedimentos de reconhecimento mútuo (PRM) e descentralizados (DCP), nos quais Portugal atua como estado membro de referência (PT-EMR).

3. Análise SWOT

A. Pontos Fortes

A.1. Integração e Acolhimento inicial

Desde logo que os primeiros dias de estágio no Infarmed se revelaram como um ponto forte na minha análise SWOT. Todos os estagiários foram recebidos com uma formação inicial, dada pelo Dr. José Viana em representação da Direção de Recursos Humanos, Financeiros e Patrimoniais (DRHFP), que nos introduziu às instalações físicas, à organização estrutural e funcional do instituto e às normas e políticas vigentes. No final da sessão, todos os estagiários foram encaminhados para os respetivos orientadores de estágio de cada departamento, sendo, posteriormente, divididos pelas unidades e equipas correspondentes. No meu caso, fui integrada na equipa PT-EMR, na DAM-UMM, tendo como orientadora a Dr.^a Dina Cordeiro Lopes. Nos restantes dias da primeira semana, assisti, enquanto estagiária da DAM-UMM, a várias formações teóricas, no âmbito dos Assuntos Regulamentares do Medicamento, com vista à revisão dos tipos de procedimentos de registo dos MUH e dos tipos de alterações aos termos de AIM e à introdução das várias plataformas informáticas utilizadas como ferramentas de trabalho na DAM - **SMUH-ALTER** (plataforma de submissão de pedidos de alteração do sistema de gestão de medicamentos de uso humano), **GIMED** (base de dados de Gestão de Informação de Medicamentos), **GestProc** (base de dados de Gestão de Processos), **GPRen** (base de dados de gestão de Processos de Renovação) e **CTS** (*Communication and Tracking System*). Toda esta contextualização foi essencial para entender o propósito final das tarefas que me seriam depois concedidas.

A.2. Equipa técnica da UMM/PT-EMR

Devido ao empenho na receção aos estagiários, à disponibilidade mostrada para o esclarecimento de dúvidas e à partilha de conhecimentos e experiências de livre vontade, considero toda a equipa técnica da UMM/PT-EMR um ponto forte do meu estágio. Valorizo o plano de estágio previamente delineado e a formação inicial sobre as bases teóricas e legais respeitantes aos processos de renovação que iria depois gerir. Os colaboradores da equipa da UMM/PT-EMR são farmacêuticos especializados em assuntos regulamentares do medicamento e atuam como gestores de processos pós-AIM, divididos em grupos consoante a sua classificação ATC (*Anatomical Therapeutic Chemical Code*). Apesar de ter sido a colaboradora, Dr.^a Ana Mimoso, a primeira responsável pela minha aprendizagem e

integração na equipa, gradualmente fui contactando com os restantes colaboradores que contribuíram, de igual forma, para o meu desempenho enquanto estagiária.

A.3. Tarefas desempenhadas

Após a integração na equipa UMM/PT-EMR, as tarefas que me foram atribuídas incluíram, unicamente, a gestão de processos de renovação de AIMs para DCPs e PRMs, nos quais Portugal era EMR. Durante a minha atividade enquanto gestora, destaco a relevância do documento *Best Practice Guide on the processing of renewals in the Mutual Recognition and Decentralised Procedures*, pertencente ao *Co-ordination Group for Mutual Recognition and Decentralised Procedures (CMDh)*⁵, ao qual recorri frequentemente para me guiar. A gestão de cada processo começava pela análise da documentação submetida - por CESP (*Common European Submission Portal*), SMUH-ALTER ou em papel - e seguia com a sua validação, contactando os titulares, através do envio de pedidos de elementos, sempre que houvesse inconformidades ou necessidade de informação adicional. Depois, procedia-se à submissão do calendário adequado e à finalização do processo com a divulgação do resultado da renovação, nas plataformas *online*. No meu estágio apenas geri por completo, isto é, validei, iniciei calendário e finalizei com aprovação, renovações de calendário reduzido (30 dias), sendo que nas de calendário completo (60 + 30 dias) apenas procedi à fase da validação. O detalhe das tarefas desempenhadas pode ser consultado no Anexo I. Em todos os passos era essencial comunicar (por *e-mail* e/ou chamada telefónica) com os titulares responsáveis pelo medicamento em questão e a atualizar, regularmente, as plataformas de gestão *online* (SMUH-ALTER, GPRen e CTS) a fim de ser conhecida a evolução do processo. Para além destas tarefas, contribuí, também, para a atualização e/ou correção dos dados constantes na base de dados GIMED e na plataforma europeia CTS sempre que surgissem novas informações no decorrer da análise de cada processo, e para a construção de novos modelos de pedidos de elementos.

Logicamente que qualquer função por mim desempenhada no decorrer deste estágio se manifesta como um ponto forte, desde logo por se traduzir na aquisição de novos conhecimentos e conseqüente enriquecimento da minha formação.

A.4. Autonomia e Responsabilidade

Um dos pontos fortes mais evidente deste estágio foi o constante incentivo, por parte dos colaboradores, à minha autonomia na realização das tarefas incumbidas, principalmente ao nível da comunicação com os titulares. Após as várias formações de introdução e leitura das normas orientadoras legais, fiquei inteiramente responsável pela gestão da renovação de

um conjunto de processos, fazendo cumprir todas as etapas necessárias com o objetivo de os finalizar. Todas as decisões entre as várias etapas eram tomadas por mim, nunca deixando, contudo, de serem supervisionadas pelos colaboradores responsáveis. Ao longo do estágio, o sentido de responsabilidade foi crescendo com a perceção do impacto das minhas decisões no fluxo de trabalho dos restantes gestores e ao nível da Indústria Farmacêutica. A meu ver, quer a autonomia, quer o sentido de responsabilidade são valências indispensáveis num futuro profissional de saúde.

A.5. Competências Desenvolvidas

Nomeio, também, como ponto forte relevante do meu estágio o fortalecimento de várias competências que julgo serem indispensáveis para vingar no mercado de trabalho atual. As mais evidentes foram as competências informáticas, dado que a gestão dos processos passava pela consulta, operacionalização e atualização de vários *softwares* internos, incluindo base de dados (GIMED) e plataformas de gestão - nacionais (SMUH-ALTER, GestProc e GPRen) e europeias (CTS) - e de submissão de documentos (CESP, EudraGMP, Eudralink). Na verdade, a aprendizagem do modo de funcionamento de cada um foi para mim um desafio, que depressa se converteu numa habilidade adquirida. Para além destes, refiro a agilidade que ganhei na extração rápida de informação de documentos extensos, durante a fase de validação processos, e destaco as capacidades desenvolvidas ao nível da comunicação de carácter formal, pelos vários contactos que estabeleci com os titulares, nacionais e europeus, de forma a gerir da melhor forma os processos respeitantes aos seus medicamentos. Inquestionavelmente, todas estas valências permitiram a melhoria progressiva na execução das minhas tarefas, diminuindo, gradualmente, os pedidos de ajuda aos colaboradores da equipa.

B. Pontos Fracos

B.I. Foco único em processos de Renovação

O foco único na gestão de processos de renovação, em que Portugal é EMR, acabou por se tornar, na minha opinião, um ponto fraco do meu estágio. Apesar de ser uma tarefa morosa e com uma certa complexidade houve, em algumas ocasiões, momentos parados que poderiam ter sido aproveitados para a aprendizagem de outros tópicos. Também o facto de estar confinada à equipa PT-EMR limitou o acesso às restantes equipas da UMM, impedindo o contacto com outro tipo de processos, nomeadamente pedidos de AIM e processos em que Portugal é EME. Penso que futuros estágios na DAM deverão permitir a passagem dos

alunos por mais que uma unidade, ou, dentro da mesma, pelas várias equipas que a compõem, de forma a conhecerem as diferentes realidades que se vivem diariamente no Infarmed, no âmbito da avaliação de medicamentos.

B.2. Fluxo de trabalho irregular

Apesar de ter um plano de estágio delineado, houve momentos em que as tarefas a executar mal preenchiam um dia de trabalho e outros, pelo contrário, em que estas demoravam dias a serem concluídas. A irregularidade no fluxo de trabalho devia-se aos atrasos constantes, por parte dos titulares, na resposta aos pedidos de elementos submetidos para cada processo, após a análise da sua documentação. Estes atrasos impediam o avanço dos processos para as fases seguintes, acabando por levar à sua acumulação, sem que eu pudesse intervir. Relacionando com o ponto anterior, o foco exclusivo em processos de renovação aliado ao pouco tempo livre dos colaboradores, devido à elevada carga de trabalho que os assistia, impediu que os momentos parados fossem preenchidos com outras atividades. Contudo, apesar de considerar este tópico um ponto fraco do meu estágio, reconheço que nenhum esforço faltou aos gestores da equipa PT-EMR, que sempre se mostraram disponíveis, apesar do tempo contado, a explicar-me novas matérias e a esclarecer as minhas dúvidas, sobre qualquer assunto. Na minha opinião, este ponto poderá ser evitado, no futuro, com a atribuição de tarefas mais diversificadas, como a gestão adicional de alterações, ou através da elaboração de um plano de estágio mais amplo, que englobe a integração dos estagiários em mais do que uma equipa/unidade.

C. Oportunidades

C.1. Submissão eletrónica dos processos via SMUH-ALTER

Desde fevereiro de 2017 que passou a ser obrigatória a submissão eletrónica, na plataforma de gestão interna SMUH-ALTER, da documentação de suporte aos processos de renovação. O SMUH-ALTER é uma ferramenta de grande utilidade, quer para as renovações, quer para as alterações, que permite, para além da submissão de documentos, a gestão e a avaliação dos respetivos processos, através da comunicação com os titulares.

A possibilidade de aprender as funcionalidades do SMUH-ALTER tornou-se numa mais-valia para o meu estágio, não só por agilizar o acesso e a organização dos processos, como também por me permitir conhecer outra forma de comunicação entre o Infarmed e a Indústria, aquando os pedidos para renovações ou alterações de AIM.

C.2. Assistir a uma reunião da Comissão de Avaliação de Medicamentos

No penúltimo dia de estágio foi dada a todos os estagiários da DAM a oportunidade de assistir a uma reunião da Comissão de Avaliação de Medicamentos (CAM). Estas reuniões são realizadas periodicamente, segundo um calendário definido, e pretendem analisar os pareceres, elaborados por peritos, de pedidos de AIM, de alterações ou de renovações, na presença de avaliadores Farmacêuticos, Médicos e Toxicológicos. Durante a reunião, colocam-se questões e esclarecem-se dúvidas, nomeadamente quando surgem pareceres discordantes ou não positivos, que dificultam a aprovação de um dado processo. Naturalmente, todas as decisões são tomadas com vista à garantia da qualidade, eficácia e segurança de todos os medicamentos analisados.

C.3. Visita às instalações do Laboratório do Infarmed

Considero a visita guiada às instalações do Laboratório do Infarmed como uma oportunidade única, não só a nível pessoal, como a nível profissional. Este é um laboratório de referência, acreditado pela norma ISO/IEC 17025, que integra a rede de laboratórios qualificados da Organização Mundial de Saúde (OMS). Divide-se em duas áreas laboratoriais - Química e Tecnologia Farmacêutica e Biologia e Microbiologia - onde se analisam **medicamentos de síntese química** - selecionados anualmente, de acordo com o seu risco, a fim de comprovar a sua conformidade com o módulo da qualidade do *dossier* de AIM - e **medicamentos biológicos**, como as vacinas e os hemoderivados, respetivamente. Para além destes, o laboratório é também responsável pela análise de medicamentos que apresentem suspeita de falsificação, adulteração, entre outras inconformidades, e de produtos cosméticos e dispositivos médicos.

C.4. Contacto com profissionais das equipas UMM/PT-EMR e UIM/PT-EMR

Ter oportunidade de contactar, ao logo dos três meses de estágio, com farmacêuticos especialistas em assuntos regulamentares do medicamento, foi, sem dúvida um privilégio. Os colaboradores da equipa UMM/PT-EMR são profissionais dotados de extrema competência, que elevam Portugal, enquanto EMR, nos *rankings* europeus. A sua vasta experiência catalisou a minha progressão enquanto gestora temporária, amadurecendo as minhas capacidades de trabalho. Para além deste aspeto, a inclusão no mesmo espaço físico das equipas UMM/PT-EMR e UIM/PT-EMR possibilitou-me a interação com outros profissionais, para além dos que constituíam a minha equipa. De facto, a proximidade entre as duas equipas é essencial para a rastreabilidade dos processos em comum, permitindo a sua continuidade desde a fase pré-AIM até à fase pós-AIM. A oportunidade de contactar com os

colaboradores da equipa UIM/PT-EMR, que sempre se mostraram disponíveis para a resolução de problemas relacionados com os meus processos, permitiu-me encarar de outra perspetiva o ciclo de vida dos medicamentos, enriquecendo o meu estágio e os meus conhecimentos no âmbito dos assuntos regulamentares.

D. Ameaças

D.I. Falha nos recursos tecnológicos

Foram várias as vezes que o mau funcionamento dos meios eletrónicos de trabalho, sobretudo os computadores, atrasaram o seguimento dos processos. Frequentemente estes bloqueavam ou desligavam sem explicação, comprometendo o trabalho quer dos colaboradores, quer dos estagiários. Para além dos problemas de *hardware*, alguns dos *softwares* internos utilizados pelo Infarmed apresentam problemas técnicos como, por exemplo, o lento processamento do GIMED e a impossibilidade de carregar ficheiros com tamanho superior a 10Mb no SMUH-ALTER, o que complicava a gestão dos processos. Devido ao impacto na saúde pública que o trabalho desenvolvido pelo Infarmed apresenta, acredito que estas ferramentas deveriam ser atualizadas para versões modernas mais rápidas e mais úteis, de forma a facilitar o trabalho dos colaboradores.

4. Conclusão

De facto, é de louvar a oportunidade única que a FFUC fornece aos seus alunos de realizarem um segundo estágio, para além do estágio em Farmácia Comunitária, noutra campo de atuação farmacêutica.

Os três meses de estágio curricular no Infarmed, para além de todos os conhecimentos adquiridos, nas formações e explicações facultadas na área dos assuntos regulamentares, permitiram-me desenvolver inúmeras competências, através do contacto que estabeleci com todos os colaboradores e das tarefas que desempenhei. Aprendi, entre outros aspetos, a importância do rigor na análise e validação dos vários processos e de que forma as decisões tomadas por uma autoridade regulamentar influenciam o mercado farmacêutico, nacional e internacional, e, conseqüentemente, a saúde pública. Sem dúvida que o meu estágio no Infarmed veio enriquecer a minha formação e tornar-me mais ciente dos vários ramos profissionais onde os farmacêuticos são indispensáveis.

5. Bibliografia

1. INFARMED, I.P. - **Apresentação**. [Acedido a 17 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/apresentacao>
2. Decreto-Lei n.º 46/2012 de 24 de Fevereiro de 2012 do Ministério da Saúde, Diário da República, 1.ª Série, nº 40 de 24 de Fevereiro de 2012.
3. INFARMED, I.P. - **Estrutura e Organização**. [Acedido a 18 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/estrutura-e-organizacao>
4. INFARMED, I.P. - **Direção de Avaliação de Medicamentos (DAM)**. [Acedido a 18 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/estrutura-e-organizacao/dam>
5. HEADS OF MEDICINES AGENCIES: CMDH - **Best Practice Guide on the processing of renewals in the Mutual Recognition and Decentralised Procedures**. [Acedido a 20 de julho de 2018]. Disponível na Internet: http://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human_Medicines/CMD_h_/procedural_guidance/Renewal/CMDh_004_2005_Rev16_02_2018_clean.pdf

6. Anexos

Anexo I - Lista detalhada dos passos a seguir na gestão das Renovações de Calendário Reduzido

1) Fase de Validação

- Análise da documentação submetida através da comparação com os dados constantes nas plataformas GIMED e CTS e documentação guardada na rede;
- Envio de pedido de elementos, ao requerente, se forem detetadas inconformidades ou ausência de informação;
- Validação da documentação após serem feitas as devidas correções, se for caso disso.

2) Submissão do Calendário Reduzido (30 dias)

- Notificação, através de *e-mail*, do titular e XY todos os EME das datas de início (dia 0) e fim (dia 30) do calendário;
- Atualização das plataformas CTS e SMUH-ALTER (caso o processo tenha sido submetido eletronicamente) com as datas do dia 0, 20 (dia para o envio dos comentários, ao processo, dos EME) e 30 do calendário;
- Durante o calendário, contactar o requerente sempre que houver comentários emitidos pelos EME.

3) Finalização da Fase Europeia (dia 30)

- Notificação do titular e EME da finalização da Fase Europeia e do respetivo resultado da renovação (dia 30 do calendário), com a emissão do documento *End of Procedure* (EoP);
- Atualização, com o estado do processo, das plataformas SMUH-ALTER, para os processos submetidos eletronicamente, e GPRen, para os restantes.

4) Finalização da Fase Nacional

- Notificação do titular da finalização da Fase Nacional através de *e-mail*, no caso dos processos submetidos eletronicamente, ou da emissão de ofício, para os restantes.

Parte III

Monografia

*As Células CAR-T como uma terapia anticancerígena – desafios atuais e
oportunidades futuras*

Lista de Abreviaturas

ACTs - Terapias Celulares Adotivas

AML - Leucemia Mielóide Aguda

ATMP - Medicamentos de Terapia Avançada

B-ALL - Leucemia Linfoblástica Aguda das células B

B-CLL - Leucemia Linfocítica Crónica das células B

BCMA - Antígeno de Maturação das células B

BHE - Barreira Hematoencefálica

BiTE - *Bispecific T cell engager*

B-NHL - Linfoma Não-Hodgkin das células B

BPDCN - Neoplasma das células dendríticas (*Blastic Plasmacytoid Dendritic cell Neoplasm*)

CAR - Recetor Quimérico de Antígeno

CEA - *Carcinoembryonic Antigen*

CRS - Síndrome de libertação de citocinas

Cy - Ciclofosfamida

DLBCL - Linfoma Difuso das células B (*Diffuse Large B-cell Lymphoma*)

EGFRvIII - Variante III do recetor do Fator de Crescimento Epidérmico

Flu - Fludarabina

GTMP - Produtos de Terapia Genética

HLA - *Human Leukocyte Antigen*

IgK - Cadeia *kappa* da Imunoglobulina

IL-13R α 2 - Recetor α 2 da IL-13

IL-6R - Recetor da IL-6

IND - *Investigational New Drug*

MDSCs - Células Mieloides Supressoras (*myeloid-derived suppressor cells*)

MHC - *Major Histocompatibility Complex*

MM - Mieloma Múltipo

NTX - Neurotoxicidade

PBMC - Células sanguíneas mononucleares periféricas

PCR - Proteína C reativa

PMBCL - Linfoma Primário Mediastinal das células B (*Primary Mediastinal B-cell Lymphoma*)

PNE - Neo-epítomos peptídicos

scFv - Fragmento variável de cadeia simples

SNC - Sistema nervoso central

SynNotch - *Synthetic Notch receptors*

TALEN[®] - *Transcription Activator-like Effector Nuclease*

TALEs - *Transcription activator-like effectors*

TAMs - *Macrófagos Tumorais (tumor-associated macrophages)*

TCR - *Recetor das células T*

TFL - *Linfoma Folicular Transformante (Transformed follicular lymphoma)*

UCART - *Universal Chimeric Antigen Receptor T-cells*

VWF - *Fator de Von Willebrand*

Resumo

A administração de células T geneticamente modificadas para expressarem um recetor quimérico de antígeno (CAR) tem demonstrado resultados extraordinários em ensaios clínicos com pacientes portadores de leucemias e linfomas, recidivantes ou refratárias, das células B, nomeadamente na leucemina linfoblástica aguda (r/r B-ALL). A expressão do CAR permite que as células T direcionem a sua atividade anti-tumoral endógena para um determinado antígeno alvo, resultando na destruição de um tipo de tumor específico. Neste âmbito, a agência regulamentar Norte Americana (FDA) aprovou, no ano passado, os dois primeiros produtos contendo células CAR-T - **KYMRIAH**[®] pertencente à Novartis e **YESCARTA**[®] à Kite Pharma - para o tratamento de r/r B-ALL e linfoma Não Hodgkin das células B (B-NHL), respetivamente.

Porém, apesar do benefício clínico associado às terapias com células CAR-T, estas apresentam algumas falhas maioritariamente relacionadas com questões de segurança, ainda por resolver.

Este trabalho apresenta alguns dos pontos-chave atualmente relacionados com as células CAR-T, nomeadamente as aplicações emergentes promovidas quer pelas grandes companhias farmacêuticas, quer pelas pequenas e médias indústrias biotecnológicas e os casos fatais dos ensaios clínicos, decorrentes dos efeitos tóxicos (síndrome de libertação de citocinas e neurotoxicidade), indicando quais os fatores de risco associados. Adicionalmente, ilustra o progresso das terapias com células CAR-T ao nível do tratamento de tumores sólidos e as últimas inovações no *design* de CARs.

Palavras-chave: células CAR-T, leucemias e linfomas das células B, síndrome de libertação de citocinas, neurotoxicidade, segurança, *CAR design*.

Abstract

Infusion of chimeric antigen receptor (CAR)-genetically modified T cells (CAR-T cells) have shown outstanding results in clinical trials with patients suffering from relapsed or refractory B-cell malignancies, mainly B-cell acute lymphoblastic leukemia (r/r B-ALL). The expression of the CAR enables the redirection of T cell's endogenous antitumor activity to a target surface antigen, resulting in the destruction of a specific type of tumor. During the last year, the U.S. Food and Drug Administration (FDA) approved the first two CAR-T cell products - **KYMRIAH**[®] from Novartis and **YESCARTA**[®] from Kite Pharma - for the treatment of r/r B-ALL and B-cell Non Hodgkin's lymphoma (B-NHL), respectively.

However, besides the clinical benefit established for CAR-T cell-based therapy, there are several issues, mostly due to safety challenges, yet to be overcome.

This work presents some of the key points that are currently related to CAR-T cell therapies, such as, the emerging applications from both large pharmaceutical companies and small/medium biotechnology industries and the fatal outcomes of clinical trials related to the life-threatening toxicities (cytokine release syndrome and neurotoxicity) indicating the major associated risk factors. Additionally, this work illustrates the progresses made in CAR-T cells-based therapies for solid tumors and the latest innovations in CAR design.

Keywords: CAR-T cells, B-cell malignancies, cytokine release syndrome, neurotoxicity, safety, CAR design.

I. Introdução

Mesmo após anos de evolução tecnológica e farmacêutica, as doenças oncológicas continuam a ser um dos focos centrais da comunidade científica. Nas últimas décadas, a possibilidade de usar o conceito de imunoterapia em oncologia - estimulação e reforço do sistema imunitário do paciente para que este reconheça e destrua células tumorais - veio revolucionar a história das terapias anti-cancerígenas¹. Neste âmbito, no ano passado, foram aprovados pela agência regulamentar Norte Americana (FDA) dois novos produtos - **KYMRIAH**[®] lançado pela Novartis² e **YESCARTA**[®] pela Kite Pharma³ - contendo uma nova e promissora tecnologia para o tratamento de alguns tipos de leucemias e linfomas dos linfócitos B - as **Células CAR-T**. As células CAR-T derivam da modificação genética de células T, autólogas ou alogénicas, que passam a expressar, à sua superfície, um recetor quimérico de antigénio, **CAR** (*Chimeric Antigen Receptor*), específico para um dado antigénio tumoral¹. A expressão superficial do CAR permite que as células sejam capazes de direcionar a sua ação efetora anti-tumoral para tecidos cancerígenos previamente estabelecidos¹.

O presente trabalho pretende ilustrar qual o panorama atual do mercado farmacêutico das células CAR-T, caracterizando, não só, o *pipeline* da indústria farmacêutica de grande dimensão (*big pharma*), como também os produtos inovadores emergentes, igualmente promissores, de pequenas e médias empresas biotecnológicas. Para além destes aspetos, focar-se-á nos pontos negativos associados a estas terapias, nomeadamente, os efeitos secundários severos potencialmente fatais⁴ - **síndrome de libertação de citocinas e neurotoxicidade** - fazendo alusão às mortes ocorridas nos ensaios clínicos e às possíveis causas e fatores de risco que lhes estão associados^{5,6}. No seguimento deste tópico, apresentam-se quais as estratégias, dando ênfase às mais atuais, para a promoção da segurança *in vivo* das terapias com células CAR-T⁷. Na parte final, referem-se não só os progressos que têm sido feitos ao nível do tratamento de tumores sólidos, destacando os desafios relacionados com o microambiente tumoral imunossupressivo e com a procura de novos antigénios alvo⁸, como também as últimas inovações relacionadas com o *design* de CARs, nomeadamente a mais recente - o **SUPRA CAR**⁹.

II. Células CAR-T

Da primeira geração às *Smart T cells*

A imunoterapia com células CAR-T insere-se no grupo das Terapias Celulares Adotivas (ACTs)^{10,11}. As ACTs são um tipo de imunoterapia de extrema complexidade que se baseia na administração de células T anti-tumorais **autólogas** - células do próprio paciente - ou **alogénicas** - células de um dador - modificadas geneticamente ou não, dependendo da sua origem¹¹. A escolha dos linfócitos T como grupo celular base das ACTs deve-se à variedade de funções efetoras anti-tumorais que estes possuem, como por exemplo a libertação de grânulos citotóxicos, que lisam as células alvo, e a produção e libertação de citocinas, que recrutam outras células imunitárias¹².

As células CAR-T são, assim, linfócitos T, autólogos ou alogénicos, geneticamente modificados, de forma a expressarem à sua superfície CARs, que se caracterizam como sistemas de recetores **artificiais** e **universais**⁴. Estes permitem direcionar a ação antitumoral endógena das células T para tecidos que contenham o antigénio para o qual são específicos¹³. Em termos mecanísticos, após a ligação entre o antigénio alvo e o CAR, a célula CAR-T fica ativada, prolifera e destrói a célula cancerígena, independentemente do nível de expressão das moléculas MHC (*Major Histocompatibility Complex*)¹⁴. Esta característica permite-lhes manter a sua atividade anti-tumoral, mesmo em situações de escape ao sistema imunitário típicas dos microambientes tumorais imunossupressores⁴. Assim, a terapia com células CAR-T tem um carácter universal, sendo passível de ser administrada a qualquer paciente, sem ter em consideração a compatibilidade genética com sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*)¹⁵.

Segundo o Regulamento (CE) n.º 1394/2007 de 13 de Novembro de 2007¹⁶, as células CAR-T estão englobadas na subclasse de Medicamentos de Terapia Avançada (ATMP) e, dentro destes, são designadas por produtos de terapia genética (GTMP)¹⁷ dotados de auto-proliferação e de persistência *in vivo*⁷.

Em termos estruturais, os CARs apresentam uma estrutura molecularmente simples, constituída por uma cadeia polipeptídica repartida em domínios com funções distintas¹⁵. Todas as gerações de CARs partilham um esqueleto comum dividido em três domínios principais. A porção mais externa diz respeito ao **domínio extracelular**, que corresponde ao local de ligação entre o CAR e o antigénio tumoral de interesse¹. Este domínio é constituído por um fragmento variável de cadeia simples (scFv) composto pelas regiões variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve de um anticorpo monoclonal reativo ao antigénio tumoral a rastrear^{1,18}. É, portanto, o domínio extracelular que dita a afinidade e a

especificidade do CAR para o antígeno alvo. Seguindo para o interior, a parte extracelular encontra-se ligada a uma região **transmembranar** - composta por homodímeros das moléculas CD8 e CD3⁴ - por meio de um **espaçador** (*hinge region*)^{1,8}, constituído pelas regiões constantes um e dois da cadeia pesada (C_{H1}-C_{H2}) da Imunoglobulina G₁¹⁵. No fim da região transmembranar encontra-se o **domínio de sinalização intracelular** derivado da cadeia zeta do complexo proteico CD3 (CD3ζ) da componente de transdução de sinal do recetor das células T (TCR)⁴. É o domínio CD3ζ que permite a ativação das células CAR-T perante a ligação do CAR ao antígeno alvo¹⁹.

A **primeira geração** de células CAR-T era apenas constituída por um scFv extracelular, um domínio transmembranar e uma cadeia de sinalização intracelular CD3ζ¹⁵. Esta construção mostrou-se bastante limitativa, em termos de eficácia clínica, devido à baixa proliferação e persistência das células CAR-T *in vivo*^{4,7}. Na expectativa de otimizar a sua eficiência terapêutica, surgem a **segunda** e a **terceira gerações** com a incorporação de um e de dois **domínios de co-estimulação**, respetivamente, na região de sinalização intracelular¹⁵. Os mais utilizados, decorrente de resultados de eficácia apresentados em estudos clínicos, pertencem às famílias **CD28** e **CD137/4-1BB**, embora haja outros como ICOS/CD278 ou OX40/CD34²⁰. Os sinais de co-estimulação gerados traduzem-se num segundo sinal de ativação que complementa a ativação primária pelo domínio de sinalização CD3ζ²⁰. Em termos de comparação, células T que expressem CARs contendo o domínio 4-1BB apresentam uma maior persistência *in vivo*, sendo as mais adequadas em terapias prolongadas para a prevenção do reaparecimento de tumores, já que permanecem no organismo mesmo após a eliminação da carga tumoral inicial⁷. Contrariamente, os CD28 CARs revelam uma atividade tumoricida mais potente, associada uma maior *clearance* tumoral²⁰, que lhes permite induzir de forma mais rápida e precoce o estado de remissão oncológico⁷. Assim, a segunda e a terceira geração de CARs promovem a proliferação e persistência *in vivo* das células T, elevam a secreção das citocinas IL-2 e IFN β⁷, inibem o crescimento tumoral, reforçam a função citotóxica²⁰ e prolongam a sobrevivência das células CAR-T através do aumento da sua resistência à apoptose^{4,15,21}. A figura 2 representa a estrutura de um CAR de segunda geração²².

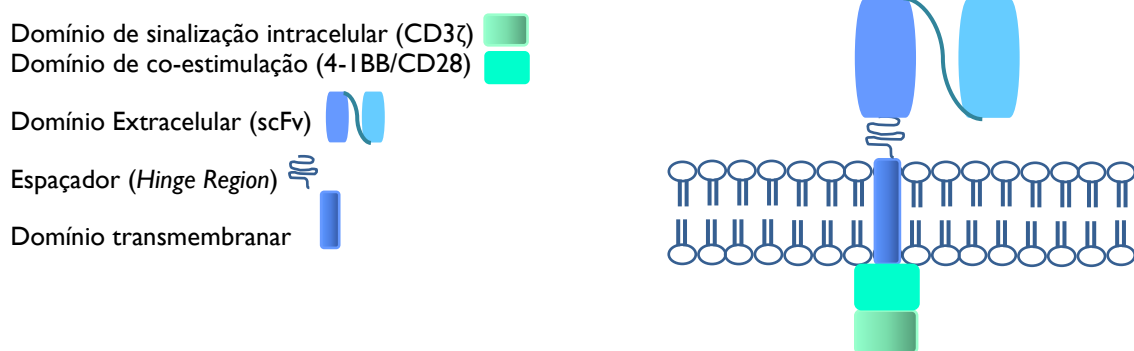


Figura I - Estrutura de um CAR de 2ª geração com legenda (Adaptado)²².

Segue-se a ambiciosa **quarta geração**, onde as células CAR-T, também designadas de **TRUCKs**, são adicionalmente modificadas de forma a expressarem proteínas transgênicas, que se depositam num tecido alvo específico, rastreado pelo CAR¹⁵. As células TRUCK surgiram com o objetivo de dotar as células CAR-T convencionais com novas armas contra um microambiente tumoral altamente imunossupressor⁷. Estas associam a expressão de um CAR de segunda geração com a libertação para o meio extracelular de fatores como citocinas, que visam modular a resposta das células T, ligandos co-estimulatórios, que aumentam a atividade anti-tumoral ou enzimas, como a heparinase, que facilitam o acesso à superfície do tumor por degradarem a matriz extracelular associada ao microambiente tumoral^{8,4}. Laboratorialmente, ocorre a transferência de dois transgenes: um expresso de forma constitutiva correspondente ao CAR, e outro expresso de forma indutiva correspondente à molécula de interesse, sendo que ambos são integrados em regiões genómicas diferentes^{4,15}. Ao ser expresso de forma indutiva, a libertação do produto transgênico apenas ocorre quando o CAR se liga ao antígeno alvo, o que permite que a deposição seja local e associada a uma menor incidência de toxicidade sistémica¹⁵. O composto mais utilizado é a **IL-12** - uma potente citocina capaz de recrutar e ativar células da imunidade inata que destruam as células cancerígenas não reconhecidas pelo CAR, evitando a recidiva tumoral¹⁵.

Apesar dos progressos feitos no âmbito da eficácia terapêutica das células CAR-T, a segurança continua a ser um parâmetro prioritário e difícil de assegurar⁹. Devido ao facto de serem sistemas terapêuticos autónomos, uma das principais limitações prende-se com a inaptidão clínica de as controlar assim que administradas nos doentes²³. A fim de superar este desafio surgem as **smart T cells**¹. Existem vários tipos de *smart T cells*, associadas às mais diversas construções de CARs (exemplos apresentados na Tabela I), tendo cada uma um mecanismo de ação característico^{1,4,21}.

Tabela I - Tipos de Smart T cells

iCélulas CAR-T	Expressam um recetor adicional que reconhece antígenos expressos por tecidos não cancerígenos. Quando há ligação com estes, gera-se um sinal de inibição que impede a função efetora da célula CAR-T. Este sistema permite a distinção entre as células alvo e as células <i>bystander</i> não patogénicas.
Multi Células CAR-T	Uma só célula T que expressa vários CARs à superfície com especificidades antigénicas distintas.
Pooled Células CAR-T	O produto final é constituído por dois ou mais tipos de células CAR-T cada uma com uma especificidade antigénica distinta.
Células CAR-T em tandem	Células T que expressam CARs com dois domínios extracelulares, ligados em <i>tandem</i> , que reconhecem antígenos diferentes.
Células CAR-T condicionadas (Dual-antigen binding)	Separação dos processos de ativação e co-estimulação das células CAR-T em dois CARs distintos que reconhecem antígenos tumorais diferentes. A destruição das células cancerígenas só é possível na presença dos dois antígenos.
Split CAR ON-switch CAR	Separação física do domínio extracelular face aos domínios intracelulares CD3 ζ e CD28/4-1BB. A ação terapêutica das células CAR-T depende da ligação do CAR ao antígeno tumoral alvo e da adição de uma molécula exógena capaz de unir, por heterodimerização, os domínios separados. A ativação das células CAR-T controla-se através da concentração da molécula adicionada.

Processo de produção das células CAR-T

A obtenção da matéria-prima para a produção das células CAR-T varia consoante o tipo de transferência celular – na via alogénica as células recolhidas provêm de um dador saudável e na via autóloga as células são recolhidas do próprio paciente¹¹. A recolha do material celular é feita através de um processo de filtração sanguínea, designado de **leucaferese**, que permite a obtenção de uma amostra não seletiva de células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC)^{1,24}. Os linfócitos T são recolhidos na forma de mistura policlonal, que inclui linfócitos de função efetora (T_{citox}), reguladora (T_{reg}) e auxiliar (T_{helper})¹². Apesar de serem o componente maioritário, o filtrado contém, inevitavelmente, outro tipo de células. Na verdade, a variabilidade na composição das células recolhidas por leucaferese é um fator incontrollável e com um grande impacto no processo de fabrico das células CAR-T¹². Por esta razão, torna-se necessária a remoção ou diluição dos outros grupos celulares, através de processos de enriquecimento do produto em linfócitos T¹². Tal procede-se pela adição,

ao meio de cultura, do anticorpo monoclonal anti-CD3²⁵, que estimula a diferenciação²⁶, e da **IL-2**, uma citocina que atua como fator de crescimento das células T, promovendo a sua expansão e ativação²⁷. Após amplificação *ex vivo*, os linfócitos são transduzidos por meio de um **vetor viral** que contém o gene codificante do CAR²⁵. Os vetores preferenciais para a transdução das células CAR-T são vetores retrovirais, nomeadamente, os vetores **retrovirais gama** e os **lentivírus**¹. Os retrovírus consideram-se os mais fiáveis devido à sua capacidade de integração genética estável, que possibilita a expressão prolongada do transgene na célula infetada²¹. A inserção do transgene ocorre a partir da infeção viral dos linfócitos T *in vitro* e, por sua vez, a taxa de infeção e a consequente expressão do CAR dependem do título infeccioso do vírus¹². Existem, no entanto, estratégias alternativas aos vetores virais, como por exemplo a **eletroporação** e os **transposões**, que são mais adequadas quando se requer uma curta persistência da expressão do transgene²¹.

As células T modificadas são, posteriormente, identificadas através da co-cultura com linhas celulares tumorais contendo o antígeno alvo¹¹, e amplificadas, em meio de cultura contendo IL-2, até atingirem os níveis terapêuticos²⁵.

As Células CAR-T na prática clínica

Apesar dos primeiros estudos clínicos reportados com células CAR-T terem incluído pacientes com tumores sólidos²⁸, foi no tratamento de cancro dos sistemas hematopoiético e linfóide, com **CARs anti-CD19**, que estas encontraram o caminho do sucesso¹. De facto, as células CAR-T anti-CD19 são particularmente ativas contra leucemias e linfomas dos linfócitos B, CD19 positivos, recidivantes ou refretários aos tratamentos de primeira linha¹⁹. Sucintamente, a expressão extracelular da proteína CD19 está restrita à linhagem das células B, incluindo células precursoras, saudáveis, malignas e plasmócitos^{29,30}. Assim, a sobre-expressão homogénea desta proteína à superfície dos linfócitos cancerígenos, torna-a num antígeno específico e característico para este tipo de cancro⁷. Contudo, é importante realçar que a presença do antígeno alvo em células não cancerígenas provoca, igualmente, a sua destruição, levando à aplasia medular e periférica de células B - efeito *on-target, off-tumor*²¹. A aplasia B, apesar de ser um efeito adverso inevitável associado ao sucesso da terapia com células CAR-T anti-CD19, é perfeitamente controlável com a administração intravenosa mensal de imunoglobulinas como terapêutica de substituição³¹.

Dentro do grupo dos cancros hematológicos CD19 positivos, as doenças com uma maior taxa de resposta ao tratamento - podendo atingir os 90 % - são a **leucemia linfoblástica aguda (B-ALL)**, os **linfomas não-Hodgkin das células B (B-NHL)** e a **leucemia linfocítica crónica (B-CLL)**, por esta ordem^{13,18,19,32}. O facto destes cancros

apresentarem, em casos de recidiva e/ou refrataridade aos tratamentos convencionais, prognósticos fracos associados a baixas taxas de sobrevivência, justifica o crescimento exponencial que tem sido observado no desenvolvimento das terapias com células CAR-T anti CD19^{13,19,30,33}. Para além dos cancros mencionados, produtos experimentais contendo o mesmo tipo de células CAR-T encontram-se, também, em investigação clínica (NCT02135406) para o tratamento do **mieloma múltiplo** (MM)³¹.

Um aspeto relevante que deve anteceder a infusão das células CAR-T consiste na administração de fármacos citotóxicos com efeitos imunossupressores^{6,34,35}. Os agentes farmacológicos imunossupressivos mais utilizados correspondem à **fludarabina** (Flu) e à **ciclofosfamida** (Cy)²¹. Os seus efeitos de linfo-depleção permitem a redução prévia da carga tumoral³⁴, minimizam o risco de rejeição do hospedeiro à infusão de células CAR-T alogénicas, e, através da diminuição da competição homeostática entre os linfócitos T endógenos³⁶, promovem a expansão *in vivo* das células CAR-T⁶. Com o regime de condicionamento, as células CAR-T atingem mais facilmente o pico máximo de proliferação⁶, o que aumenta a sua persistência *in vivo*, garantindo uma ação anti-tumoral mais prolongada e, conseqüentemente, maiores taxas de resposta⁵.

A junção de fatores como a elevada expressão do antígeno alvo, a capacidade de auto-proliferação e persistência *in vivo*, a facilidade de acesso às células cancerígenas e a administração prévia de agentes imunossupressores, suporta a elevação das células CAR-T anti-CD19 como uma nova opção viável de tratamento das B-ALL³², B-CLL e dos B-NHL¹⁹.

No entanto, perante os cancros hematológicos CD19 negativos ou fenómenos de diminuição da expressão do antígeno alvo, por rejeição imunológica ou por mecanismos de escape tumorais, a terapêutica com células CAR-T anti-CD19 falha e a doença torna-se progressiva³². Por este motivo, a procura de antígenos alvo alternativos continua, sendo os mais promissores o CD22, o CD20, a cadeia kappa da imunoglobulina (IgK) ou o recetor tirosina cinase ROR1²¹. Destaca-se o **CD22** - uma molécula expressa exclusivamente pela linhagem B, incluindo células malignas, cuja expressão é mantida mesmo após a diminuição da expressão do CD19³². Tal facto foi evidenciado pelos resultados positivos apresentados por Fry *et al* num ensaio clínico de fase I (NCT02315612), incluindo 21 adultos e crianças, para o tratamento de B-ALL resistente à terapia anti-CD19³². Os resultados obtidos - remissão completa de 73 % - são os primeiros a demonstrar atividade clínica relevante de CARs anti-CD22 em B-ALL, com efeitos anti-leucémicos e um perfil de segurança semelhantes aos das células CAR-T anti-CD19³². Com estes dados, conclui-se que é possível ultrapassar a resistência à imunoterapia por perda antigénica, utilizando CARs específicos para antígenos alvo alternativos³².

Por fim, para o tratamento de outras doenças hematológicas cancerígenas, como a leucemia mielóide aguda (AML) e o MM, os antígenos alvo que atualmente se encontram em avaliação clínica são o CD123 e o CD33 para a primeira, e o antígeno de maturação das células B (BCMA) e o CD138 para a segunda²¹.

III. Aprovações baseadas na tecnologia das células CAR-T

Os *first-in-class* da terapia com células CAR-T

KYMRIAH[®] (Tisagenlecleucel) - Novartis

No dia 30 de agosto de 2017 foi aprovado, pela FDA, o primeiro medicamento para a terapia celular com células CAR-T². **KYMRIAH**[®], pertencente à **Novartis**, é um produto pioneiro no tratamento da **B-ALL** recidivante e/ou refratária aos tratamentos convencionais (r/r B-ALL), de crianças e jovens adultos, desde os 3 até aos 25 anos de idade¹². O tisagenlecleucel (CTL019) é um produto sintetizado *ex vivo* de forma individualizada para cada paciente através da transdução, por meio de um vetor lentivírus, de células T autólogas recolhidas por leucaferese³⁷. O produto obtido tem a vantagem de ser **criopreservado**, o que permite a recolha imediata das células após a identificação do paciente e a sua conservação sem que haja impacto nas características funcionais³⁷. O transgene introduzido nas células T codifica para um **CAR anti-CD19** de segunda geração, com um domínio de co-estimulação derivado da família 4-1BB/CD137³⁸. **KYMRIAH**[®] é um fármaco biológico vivo, de administração única, resultante da reprogramação genética de células endógenas, capaz de se expandir e diferenciar, mediante ativação, quer durante o processo de fabrico, quer *in vivo*, após a sua administração¹².

A aprovação do tisagenlecleucel, por parte da FDA, teve por base os resultados obtidos no ensaio clínico **ELIANA** (NCT02435849) - um estudo multicêntrico pivô de fase II, promovido pela Novartis em colaboração com a Universidade da Pennsylvania^{12,38}. Este foi o primeiro estudo clínico pediátrico realizado à escala global a fim de avaliar a segurança e a eficácia da terapia com células CAR-T. Os resultados obtidos revelaram uma persistência contínua das células CAR-T anti-CD19 durante vinte meses, associada a uma taxa de sobrevivência, livre da ocorrência de recidivas, de 80 % aos seis meses e de 59 % aos doze meses³⁸. O ensaio encontra-se, neste momento em fase III e, segundo a última atualização, revela uma taxa de remissão geral de 81% entre os 75 pacientes que receberam o produto³⁸. Entre os efeitos secundários ocorridos destacam-se a síndrome de libertação de citocinas (CRS), a neurotoxicidade (à qual sucumbiram dois pacientes, um de encefalite e outro de

delírio), as citopenias, a síndrome de lise tumoral e as infecções sem patogéneo específico – ver Tabela 2³⁸. **KYMRIAH**[®] encontra-se também em vigilância de pós-comercialização num estudo de monitorização em fase de recrutamento (NCT02445222), a fim de avaliar a segurança da exposição a longo prazo ao tisagenlecleucel¹².

No passado dia 1 de maio, a Novartis anunciou uma nova aprovação, pela FDA, de uma segunda indicação terapêutica para o tisagenlecleucel^{39,40}. **KYMRIAH**[®] passou a estar também aprovada para o tratamento de **B-NHL**, principalmente do linfoma difuso das células B (DLBCL), em pacientes adultos com doença recidivante e/ou refratária, mesmo após a realização de duas ou mais linhas de terapia sistémica (r/r DLBCL)⁴⁰. A base científica para aprovação desta indicação foi o ensaio **JULIET** (NCT02445248) - um ensaio clínico multicêntrico em fase II, realizado à escala mundial, para testar a eficácia e a segurança da terapia com o CTL019 em pacientes adultos com r/r DLBCL⁴¹. Mais uma vez, o ensaio foi realizado em colaboração com a Universidade da Pensilvânia, e os resultados mostram uma taxa geral de resposta de 53.1 %, com 32 % dos pacientes a atingirem respostas completas⁴¹. Relativamente aos efeitos secundários, a síndrome de libertação de citocinas e os efeitos neurológicos, principalmente a encefalopatia, foram os mais prevalentes, seguidos pelas citopenias e infecções, tal como se detalha na Tabela 2⁴¹. Para além deste novo passo, a Novartis tem ainda planos adicionais em curso, como a introdução do tisagenlecleucel no mercado europeu para ambas as indicações⁴⁰.

YESCARTA[®] (*Axicabtagene ciloleucel*) - Kite Pharma

A **Kite Pharma** - uma empresa de biotecnologia dedicada ao desenvolvimento de tratamentos oncológicos inovadores baseados na engenharia genética de células T, quer com CARs, quer com TCRs - passou a pertencer à indústria farmacêutica **Gilead**, a partir do dia 3 de outubro de 2017⁴². Mais tarde, no dia 18 de outubro do mesmo ano, Kite vê aprovada, pela FDA, **YESCARTA**[®], o seu *first-in-class* na terapia com células CAR-T para o tratamento de **B-NHL** recidivante e/ou refratário (r/r B-NHL), em pacientes adultos não elegíveis para a transplantação de células estaminais autólogas³. Dentro deste grupo patológico, **YESCARTA**[®] atua contra r/r DLBCL, linfoma primário mediastinal das células B (PMBCL) e linfomas foliculares transformantes (TFL)³³. À semelhança do tisagenlecleucel, o axicabtagene ciloleucel (axi-cel) é constituído por células T autólogas geneticamente modificadas, através de um vetor retroviral gama, de forma a expressarem um CAR anti-CD19 de segunda geração, com um domínio de co-estimulação derivado da família **CD28**, aspeto no qual difere do concorrente da Novartis³³. As PBMC, recolhidas dos pacientes através de um processo de leucaferese, são co-cultivadas com um anticorpo anti-CD3 em meio de cultura

com IL-2 com o objetivo de enriquecer o produto final em linfócitos T³³. As células CAR-T produzidas são posteriormente criopreservadas, sendo administradas ao paciente no décimo sétimo dia após a leucaferese³³. O ensaio clínico que forneceu a informação científica primária respeitante à eficácia e segurança do axi-cel foi o **ZUMA-I** (NCT02348216) - um ensaio pivô e multicêntrico de fase II, que contou com a participação de 111 pacientes com r/rDLBCL, PMBCL e TFL³³. Dos 111 pacientes, os 101 que receberam a infusão de axi-cel, demonstraram uma taxa de resposta objetiva de 82 %, com 54 % de respostas completas. Todos os pacientes sofreram efeitos secundários resultantes da terapia administrada, sendo os mais frequentes as neutropenias, anemia, trombocitopenia, CRS (fatal para dois pacientes) e os efeitos neurológicos³³. Os detalhes encontram-se na Tabela 2.

Atualmente, a **YESCARTA**[®] encontra-se em avaliação clínica, nos ensaios clínicos **ZUMA-5** (NCT03105336), **ZUMA-6** (NCT02926833) e **ZUMA-7** (NCT03391466), que procuram averiguar a sua eficácia e segurança no tratamento de outros tipos de linfomas das células B quando associados a outras terapias, tal como apresentado na Tabela 3⁴³.

O *pipeline* da Kite/Gilead contém outras construções de CARs experimentais que se encontram em investigação, como o **KTE-C19**, que participa em três ensaios clínicos - **ZUMA-2** (NCT02601313), **ZUMA-3** (NCT02614066) e o **ZUMA-4** (NCT02625480) - para o tratamento de outras doenças hematológicas, como está descrito na Tabela 3⁴³. Para além deste nomeia-se o **KITE-585**, que contém um CAR específico para o BCMA, neste momento em investigação para o tratamento do MM⁴³.

Tabela 2 - Efeitos secundários mais relevantes dos ensaios clínicos promovidos pela Novartis e pela Kite

Efeitos secundários (de qualquer grau)	ELIANA (2015 -2021) (n=75)	JULIET (2015-2023) (n=99)	ZUMA-I (2015-2032) (n=101)
	Nº de pacientes afetados (%)		
Síndrome de libertação de citocinas	58 (77)	57 (57,6)	94 (93)
Efeitos neurológicos	30 (40)	46 (46,5)	65 (64)
Neutropenias febris	26 (35)	11 (11,1)	35 (35)
Infeções	32 (43)	52 (52,5)	-

Tabela 3 - Características dos ensaios clínicos promovidos pela Kite, A Gilead Company

YESCARTA® *Em associação com o anticorpo monoclonal anti PD-L1 Atezolizumab **Comparação com terapia de segunda linha <i>standard</i>	Doenças em estudo	ZUMA-1	ZUMA - 5	ZUMA-6	ZUMA-7
		DLBCL, PMBCL, TFL	NHL indolente	DLBCL*	DLBCL**
	Estado do ensaio	Fase I/II em recrutamento	Fase II em recrutamento	Fase I/II em recrutamento	Fase III em recrutamento
	Duração	01/2015-03/2032	05/2017-07/2023	06/2018-06/2023	12/2017-01/2035
	Participantes	200	50	31	350
	Promotor	Kite, A Gilead Company			
KTE-C19	Doenças em estudo	ZUMA-2	ZUMA-3	ZUMA-4	
		MCL	ALL adulto	ALL pediátrico	
	Estado do ensaio	Fase II em recrutamento, multicêntrico	Fase I/II em recrutamento, multicêntrico	Fase I/II em recrutamento, multicêntrico	
	Duração	11/2015 - __	11/2015 - __	12/2015 - __	
	Participantes	80	75	75	

DLBCL - Diffuse large B cell lymphoma; PMBCL - Primary mediastinal B cell lymphoma; TFL - Transformed follicular lymphoma; MCL - Mantle cell lymphoma.

Pipeline emergente

UCARTs - Cellectis

Cellectis, uma empresa biofarmacêutica com sede em França e Nova Iorque, especializou-se no desenvolvimento de uma nova geração de imunoterapias oncológicas baseadas na edição genética de células CAR-T alogênicas, por meio da tecnologia **TALEN®** - *Transcription Activator-like Effector Nuclease*^{44,45}. Resumidamente, a tecnologia TALEN é gerada através da fusão entre os fatores **TALEs** (*Transcription activator-like effectors*) - proteínas sintetizadas por bactérias do género *Xanthomonas* que facilmente reconhecem os nucleótidos para os quais têm afinidade - e o domínio catalítico da DNA nuclease **FokI**, que pode ser adaptado para clivar uma sequência de DNA pré-definida⁴⁶. A Cellectis criou, então, os **UCART** (*Universal Chimeric Antigen Receptor T-cells*) - produtos *off-the-shelf* gerados a partir da transdução lentiviral de células T alogênicas, para a inserção do CAR, e da edição genética das mesmas, via TALEN, para a alteração/remoção de genes específicos, a fim de prevenir a sua rejeição imunológica e a competição homeostática entre as células CAR-T e as células T endógenas^{36,47,48}. Devido à tecnologia de edição genética, os UCART podem ser administrados a qualquer paciente, independentemente da compatibilidade com sistema

HLA³⁶. O primeiro *UCART* a ser testado em humanos foi o **UCART19** para o tratamento de duas crianças com r/r B-ALL CD19 positiva, fora de um ensaio clínico, tendo sido reportadas respostas favoráveis, sem a ocorrência dos efeitos secundários típicos das células CAR-T³⁶. Atualmente, em colaboração com a **Servier** e a **Pfizer**, o **UCART19** encontra-se em investigação clínica em dois ensaios de fase I, para o tratamento de r/r B-ALL - **CALM** (NCT02746952) em adultos, e **PALL** (NCT02735083) em crianças⁴⁹. Os resultados preliminares foram apresentados em dezembro de 2017 e revelaram uma taxa de remissão completa de 83 % entre os pacientes de ambos os ensaios⁴⁹. Em termos de efeitos secundários, foi registado um caso fatal, devido a CRS severa, no ensaio CALM⁴⁹. Existe, ainda, um terceiro ensaio clínico (NCT02735083), que se prolongará até 2040, destinado a avaliar a exposição a longo termo, dos pacientes dos ensaios anteriores, ao **UCART19**⁴⁹.

Os outros produtos constantes do *pipeline* da Cellectis englobam o **UCART123**, em investigação clínica para o tratamento de AML (NCT03190278) e BPDCN (NCT03203369); o **UCART22**, que recebeu, com a atribuição do estatuto de *Investigational New Drug* (IND), autorização pela FDA para proceder à fase clínica; o **UCARTCSI**, a ser testado para o tratamento de MM e, por fim, o **UCART38**, ainda em fase pré-clínica⁴⁷.

JCARx - Juno Therapeutics, a Celgene Company

Juno Therapeutics - uma empresa biotecnológica, norte americana, fundada em 2013 e recentemente adquirida pela **Celgene** - dedica-se ao desenvolvimento de produtos celulares autólogos, com CARs e TCRs, para o tratamento de doenças cancerígenas^{50,51}. O *pipeline* da Juno está, de facto, recheado com produtos compostos por células CAR-T para alvos e patologias distintas, todos estes em investigação clínica, maioritariamente em fase I⁵². Destaca-se o **JCAR017** (Lisocabtagene Maraleucel) - um produto constituído por células T autólogas modificadas por um CAR de segunda geração específico para a molécula **CD19**⁵². Neste momento, está em fase de recrutamento, desde 2015, o ensaio clínico **TRANSCEND-NHL-001** (NCT02631044), em colaboração com a Celgene, com vista à avaliação da segurança e farmacocinética do lisocabtagene maraleucel no tratamento de B-NHL, nomeadamente DLBCL e PMBCL⁵². Destaca-se, também, o **JCAR018**, o primeiro produto constituído por células CAR-T específicas para o antígeno **CD22** a ser testado clinicamente para o tratamento de r/r B-ALL e B-NHL (NCT02315612), e o **JCAR020**, constituído por células CAR-T específicas para o antígeno MUC16ecto adicionalmente modificadas para secretarem IL-12 (células TRUCK), que se encontra em investigação clínica, no *Memorial Sloan Kettering Cancer Center*, em pacientes com tumores sólidos MUC16ecto positivos (NCT02498912)⁵². Por fim, o **JCAR023**, composto por células CAR-T reativas para

o antigénio **CD171/ LICAM**, está em avaliação clínica no estudo **(ENCIT)-01** (NCT02311621) para o tratamento de neuroblastoma⁵².

Do **MB-101** ao **MB-105** - Mustang Bio

A **Mustang Bio** foi fundada em 2015 como subsidiária da empresa **Fortress Biotech, Inc**⁵³. É uma empresa de biotecnologia de fase clínica, com sede em Nova Iorque, que se foca no desenvolvimento, investimento e comercialização de tecnologias imunoterapêuticas inovadoras para o tratamento de doenças oncológicas, nomeadamente, as terapias com células CAR-T⁵⁴. Neste âmbito, através do financiamento pelo *City of Hope National Medical Center*, um centro de tratamento e investigação oncológica na Califórnia, em colaboração com o *Fred Hutchinson Cancer Research Center*, em Seattle, e com o *National Cancer Institute*, tem vindo a desenvolver vários estudos clínicos a fim de testar a segurança e eficácia de terapias com células CAR-T, com diferentes tipos de CARs, para o tratamento de diversos cancros⁵⁵. Neste momento, Mustang Bio tem dois produtos líder em ensaios clínicos de fase I - o **MB-101** (NCT02208362), para o tratamento de glioblastoma recidivante e/ou refratário, e o **MB-102** (NCT02159495), para o tratamento de AML e do neoplasma, recidivante ou refratário, das células dendríticas (r/r BPDCN)^{55,56}. O **MB-101** é constituído por células T autólogas que expressam um 4-1BB CAR específico para o **receptor $\alpha 2$ da IL-13** (IL-13R $\alpha 2$) - um antigénio típico dos gliomas, associado a baixas taxas de sobrevivência^{55,57}. Este CAR tem a particularidade de conter um *linker* mutado, de forma a diminuir as interações *off-target* entre o CAR e os recetores Fc⁵⁷. Inicialmente, o estudo apenas incluiu um paciente e os resultados demonstraram uma resposta completa mediada pelas células CAR-T anti-IL-13R $\alpha 2$, com uma regressão total de todos os tumores (primários e secundários) que persistiu por mais de sete meses⁵⁷. A resposta completa foi, no entanto, temporária, devido à morte do paciente ao décimo sexto ciclo de tratamento⁵⁷. Supõem-se que as causas sejam perda do antigénio alvo e/ou rejeição imunológica⁵⁷.

O produto **MB-102**, por outro lado, é constituído por células T autólogas modificadas geneticamente para expressarem um CD28 CAR específico para o antigénio CD123, para o tratamento da AML e r/r BPDCN⁵⁵. O ensaio, cujo objetivo consiste na determinação dos efeitos secundários e da dose terapêutica ótima do **MB-102**, está em fase de recrutamento, não tendo ainda resultados publicados⁵⁶. Para além dos dois produtos em fase de experimentação clínica, o *pipeline* da Mustang Bio conta com mais três em fase pré-clínica, desenvolvidos em parceria com o *City of Hope National Medical Center*. Os três produtos incluem o **MB-103**, o **MB-104** e o **MB-105**, cujos detalhes se encontram descritos na tabela 4^{55,56}.

Tabela 4 - Antígenos e doenças alvo de alguns dos produtos pioneiros da Mustang Bio

	Antígeno alvo	Patologia
MB-103	HER2	Glioblastoma Multiforme
MB-104	CSI	Mieloma Múltiplo
MB-105	PSCA	Cancro da próstata

HER2 - Human epidermal growth factor receptor 2; PSCA - Prostate stem cell antigen; CSI - CD2 subset

ImmuniCAR e OmmniCAR - Tc Biopharm

Tc Biopharm é uma companhia biofarmacêutica escocesa orientada, em parte, para o desenvolvimento de terapias celulares com **células T delta gama ($\delta\gamma$)** geneticamente modificadas com CARs, com vista ao tratamento de doenças virusais e oncológicas^{58,59}. As células T $\delta\gamma$ correspondem a um pequeno subtipo de linfócitos T, presentes na corrente sanguínea periférica, que se distinguem dos usuais linfócitos T_{CD8} e T_{CD4} por serem constituídos por TCRs com heterodímeros das cadeias γ e δ , contrariamente aos primeiros, que contêm cadeias α e β ⁶⁰. Este subtipo de células T apresenta fisiologicamente, à semelhança das células CAR-T, uma ação independente da expressão das moléculas MHC, o que as torna na sub-população linfocitária preferencial para adoção de estratégias imunoterapêuticas⁶⁰. Neste contexto, o *pipeline* da Tc Biopharm engloba duas plataformas tecnológicas, o **ImmuniCAR**[®] e o **OmmniCAR**^{®59}. Enquanto que o **ImmuniCAR**[®] é constituído por células T $\gamma\delta$ autólogas, o **OmmniCAR**[®] é constituído por células T $\gamma\delta$ alogénicas, sendo que ambos são geneticamente modificados para expressarem um CAR específico para um antígeno cancerígeno alvo⁵⁹. Recentemente, em dezembro do ano passado, as empresas Tc Biopharm e **Bluebird Bio** anunciaram uma colaboração estratégica, de forma a catalizarem o desenvolvimento clínico das terapias celulares com células T $\gamma\delta$ geneticamente modificadas no combate a cancros hematológicos e a tumores sólidos⁶¹.

bb2121 e bb21217 - Bluebird bio e Celgene

Em 2013, a **Bluebird Bio** - uma empresa biotecnológica de desenvolvimento clínico, perita em imunoterapias celulares - anunciou uma colaboração, à escala global, com a indústria biofarmacêutica **Celgene**^{62,63}. A aliança foi motivada pela descoberta, desenvolvimento e comercialização de tecnologias de modificação genética de linfócitos T⁶³. Nesta área, a Bluebird Bio tem, atualmente, dois produtos em investigação clínica - **bb2121** e **bb21217** - constituídos por células CAR-T 4-1BB específicas para o antígeno BCMA, um antígeno alvo preferencial para o tratamento do MM⁶⁴. Neste momento, o **bb2121**

encontra-se em desenvolvimento clínico em dois ensaios - o **CRB-401** ativo em fase I (NCT02658929), iniciado em 2016, e outro de fase II, em recrutamento (NCT03361748), iniciado em 2017 - ambos multicêntricos, com vista à avaliação da eficácia e segurança em adultos com MM refratário ou recidivante (r/r MM)^{65,66}. O *bb21217* está também em fase clínica, no estudo **CRB-402** (NCT03274219), de fase I ainda em recrutamento, também para adultos com r/r MM⁶⁶.

CD38 CAR-T e CEA CAR-T - Sorrento Therapeutics

Sorrento Therapeutics é uma indústria biofarmacêutica focada na síntese fármacos não opióides para o tratamento da dor e em terapias imuno-oncológicas, como as células CAR-T⁶⁷. Dentro deste grupo, **CEA** (*Carcinoembryonic Antigen*) **CAR-T** e **CD38 CAR-T** (IH18) são dois programas líder, ambos em fase de desenvolvimento clínico⁶⁸. O **CEA CAR-T** foi o primeiro a entrar em investigação clínica para o tratamento de tumores hepáticos metastásicos. Já o **CD38 CAR-T** encontra-se em estudo num ensaio clínico de fase I em recrutamento (NCT03464916), iniciado este ano, para avaliar a sua segurança no tratamento de r/r MM^{68,69}. A empresa revela, ainda, um produto experimental contendo um CAR específico para o antígeno CD123, em fase R&D, candidato ao tratamento da AML⁶⁸.

Tecnologia CAR-T NKG2D - Celyad

A **Celyad** é uma empresa biofarmacêutica, com sede na Bélgica e Nova Iorque, especializada no desenvolvimento de terapias celulares inovadoras, principalmente com células CAR-T, para o tratamento de doenças com baixas taxas de sobrevivência⁷⁰. O programa líder consiste na modificação genética de células T autólogas com um CAR resultante da fusão entre o recetor humano **NKG2D** - expresso à superfície das células imunitárias NK e de linfócitos T_{CD8}³¹ - e o domínio intracelular derivado da cadeia CD3ζ da porção interna do TCR⁷¹. O recetor NKG2D tem a particularidade de se associar naturalmente com dímeros da molécula **DAP10P**, que desempenham funções de co-estimulação aquando a ativação do recetor⁷². A junção entre o NKG2D-CAR e a DAP10 leva à criação de um novo sistema de reconhecimento antigénico que enaltece o papel das células CAR-T⁷². Tendo por base esta tecnologia, o produto chave da Celyad designa-se por **CYAD-01 (CAR-T NKG2D)** e encontra-se a ser avaliado em dois ensaios de fase I, para indicações clínicas distintas, cujos pormenores se apresentam na tabela 5^{*-71,73}. Para além do **CYAD-01**, a Celyad tem ainda mais quatro produtos em fase pré-clínica, o **CYAD-02** e o **CYAD-03**, baseados na tecnologia NKG2D, o **CYAD-04**, contendo um anti-CD19 CAR e o **CYAD-05** contendo um anti B7H6 CAR⁷³.

Tabela 5 - Características de alguns dos ensaios clínicos promovidos pela Celyad

		Fase, Estado, N° de participantes	End-point(s) primário(s)	Patologias
CYAD-01 (CAR-T NKG2D)	NCT02203825 (2015-2018)	Completo, com 12 participantes	Segurança e eficácia da administração do produto	AML MM AMS
	THINK NCT03018405 (2016-2020)	Fase Ib, em recrutamento, com 122 participantes estimados	Incidência de efeitos adversos resultantes da ação do produto	Cancro do ovário, bexiga, mama triplo negativo, pancreático, CRC AML e MM
	SHRINK NCT03310008 (2017-2021)	Fase I, em recrutamento, com 36 pacientes estimados	Segurança e atividade clínica da administração do produto em concomitância com terapia convencional	Mestástases hepáticas de CRC

AML - Acute Myeloid Leukemia; MM - Multiple Myeloma; CRC - Colorectal cancer; AMS - Advanced Myelodysplastic Syndrome

IV. Toxicidade associada às células CAR-T

Apesar da notória eficácia clínica das células CAR-T, pelas respostas extraordinárias que têm sido obtidas em inúmeros ensaios clínicos para o tratamento de cânceros das células B²¹, estas estão associadas a efeitos tóxicos característicos⁶.

Em novembro do ano passado, a indústria Juno Therapeutics parou, voluntariamente, o ensaio clínico de fase II **ROCKET** (NCT02535364) - onde se avaliava a eficácia e segurança do produto experimental **JCAR015** no tratamento de r/r B-ALL - após a morte de vários pacientes devido a efeitos secundários^{74,75}. Segundo o relatório da análise do ensaio, realizada por Mark Gilbert (Diretor Médico Executivo da Juno), apresentado em novembro de 2017 no encontro anual da *Society for Immunotherapy of Cancer* (SITC), este terminou após ocorrência de 5 casos fatais de neurotoxicidade, maioritariamente por edema cerebral⁷⁵. As autópsias revelaram uma disrupção acentuada da barreira hematoencefálica (BHE), com ativação da microglia e danos vasculares endoteliais, não associada, contudo, a infiltração linfocitária - por células do sistema imunitário ou pelas células CAR-T - ou a leucemia do sistema nervoso central (SNC)⁷⁵. Inicialmente, propôs-se que a causa fosse o aumento da

expansão das células CAR-T *in vivo*, derivado da associação Flu/Cy usada no regime quimioterapêutico de condicionamento⁷⁴. No entanto, após remoção da Flu, voltaram a sucumbir, por edema cerebral, mais dois pacientes, pelo que a hipótese foi descartada. Constatou-se, também, que havia uma relação direta entre o edema cerebral e o aumento dos níveis serológicos da **IL-15**, pois indivíduos com um pico de expansão das células CAR-T mais precoce apresentavam níveis mais elevados de IL-15⁷⁵. As conclusões finais do relatório levam a crer que a NTX ocorrida foi de etiologia multifatorial, dependendo não só das características clínicas dos pacientes, como também de fatores que induzem a expansão das células CAR-T *in vivo* e dos aspetos associados ao processo de fabrico, como a variabilidade entre lotes⁷⁵.

Mecanismos de Toxicidade

Síndrome de libertação de citocinas

A maioria dos pacientes com cancros hematológicos, principalmente com B-ALL, que responde ao tratamento com células CAR-T, para além da aplasia B inevitável, sofre de **síndrome de libertação de citocinas (CRS)**²¹. A CRS é um dos efeitos tóxicos específicos mais prevalentes da terapia com células CAR-T, que ocorre nos primeiros dias após a sua administração⁶. Traduz-se numa resposta inflamatória sistémica resultante da libertação de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias - como o INF γ , a IL-2, -6, -10 e -15 e o TNF α - produzidas pelas células CAR-T ativadas em proliferação³¹. A sintomatologia caracteriza-se por febres altas, mialgias, taquicardia, hipotensão, fadiga e, em casos mais severos, pode ocorrer coagulação intravascular disseminada e disfunção de múltiplos órgãos, nomeadamente falha renal, insuficiência cardio-respiratória e hepatotoxicidade^{14,21}. Atualmente, sabe-se que um dos fatores que influencia o grau de severidade da CRS corresponde à **carga tumoral** - pacientes com maior carga tumoral aquando a administração das células CAR-T tendem a sofrer CRS mais severa²¹. Para além deste, o grau de severidade relaciona-se, também, com o **nível de expressão do antígeno alvo** e com fatores que promovam a **expansão** *in vivo* das células CAR-T, como o regime de linfodepleção (Cy/Flu) prévio ao tratamento^{5,6}.

Para além destes fatores de risco, existem marcadores serológicos como a **ferritina**¹⁴, a **IL-6** e a **proteína C reativa (PCR)** - cuja produção é controlada pela IL-6 - que aumentam os seus níveis perante a gravidade da CRS⁶. Inicialmente, usavam-se **costicosteróides sistémicos** para o tratamento da síndrome, já que estes promovem o rápido desaparecimento da febre e da hipotensão⁶. Contudo, o seu uso prolongado diminuía a ação

anti-tumoral das células CAR-T²¹. Atualmente, a terapêutica de primeira linha consiste na administração de **tocilizumab** - um anticorpo que bloqueia o recetor da IL-6 (IL-6R) - em combinação, ou não, com a dexametasona⁶. A resposta da CRS ao tocilizumab reforça a hipótese de que o aumento dos níveis sistémicos da IL-6 é um ponto chave na patogénese desta síndrome⁶. Recentemente, através de um estudo realizado por Norelli *et al.* (2018) num modelo animal humanizado, descobriu-se que são os **monócitos** circulantes, e não as células CAR-T, os principais responsáveis pela ocorrência de CRS, devido à produção e libertação sistémica da IL-6. Os monócitos, para além de contribuírem para os efeitos anti-leucémicos das células CAR-T, são, juntamente com os macrófagos, a fonte primária de IL-6 e IL-1⁶. Também as células CAR-T, uma vez ativadas por reconhecimento tumoral, produzem IL-6, contudo em quantidade insuficiente para desencadear a CRS⁶. Surpreendentemente, durante o processo pró-inflamatório gerado pelos monócitos, a libertação de IL-1 precedeu a IL-6 por, aproximadamente, 24 horas⁶. Torna-se, assim, tentador afirmar, já que a IL-1 é capaz de induzir a secreção de IL-6, que a causa primária da CRS se deve à libertação de **IL-1**⁶. Desta forma, foi testado o tratamento da síndrome pelo antagonista do recetor da IL-1 - **anakinra** - e este foi tão efetivo na abolição da sintomatologia quanto o tocilizumab, sem ter impacto na atividade anti-tumoral das células CAR-T⁶. Adicionalmente, constatou-se que anakinra foi igualmente eficaz na prevenção de ocorrência da neurotoxicidade posterior à CRS, ao contrário do tocilizumab, que apenas demonstrou efeito contra a primeira⁶. Como tal, a IL-1 será um alvo a ter em atenção na intervenção farmacológica de ambos os efeitos secundários⁶.

Um último aspeto a ter em conta diz respeito ao facto da CRS severa ser aparentemente mais incidente em casos de B-ALL comparando com B-NHL⁶. Assumindo que em tumores sólidos a re-circulação sanguínea é menor, será de esperar que num linfoma o papel dos monócitos circulantes pró-inflamatórios seja menos proeminente do que nas leucemias, nomeadamente em B-ALL⁶. Tal explica que uma maior ação pró-inflamatória monocitária se traduza numa CRS mais severa⁶.

Neurotoxicidade (NTX)

A **neurotoxicidade**, apesar de menos frequente, apresenta uma taxa de letalidade mais elevada que o efeito anterior. Embora alguns autores definam a NTX como um dos sintomas característicos da CRS^{14,31}, a maioria defende-a como um fenómeno individual associado, à ocorrência de CRS severa, aparecendo durante ou depois desta.^{5,38} Num estudo conduzido por Gust *et al*“, apresentado na *American Association for Cancer Research* em 2017, foram analisados os efeitos adversos neurológicos em 133 pacientes com r/r B-ALL, B-NHL

e CLL, após tratamento com células CAR-T anti-CD19. Dos 133, 53 pacientes apresentaram um ou mais efeitos neurológicos de grau ≥ 1 e 48 destes apresentaram, concomitantemente, CRS⁵. Semelhante ao ocorrido noutros ensaios clínicos, pacientes que sofreram CRS severa (febres altas) num curto período de tempo após a administração das células CAR-T desenvolveram, subsequentemente, NTX severa^{5,38}. Em termos de sintomatologia, os sintomas mais frequentemente encontrados foram delírio (66 %), cefaleias persistentes (55 %), diminuição dos níveis de consciência (25 %) - associado a coma em 6 casos - perturbações na fala (34 %) e convulsões (8 %)⁵. Dos 133 pacientes, 4 morreram por NTX severa - edema cerebral (2), necrose laminar cortical (1) e hemorragia cerebral (1)⁵. Outros sintomas igualmente reportados, noutros ensaios clínicos, incluem tremores, confusão, afasia e sonolência¹⁹.

Segundo o estudo, os fatores de risco para o desenvolvimento de NTX severa compreendem a elevada carga tumoral e concentração medular de células CD19⁺, elevadas doses de células CAR-T administradas, co-morbilidades neurológicas pré-existentes e fatores que promovam o aumento da proliferação das células CAR-T *in vivo*, como o regime de condicionamento Flu/Cy⁵.

Em termos de biomarcadores serológicos, o grau de severidade da NTX mostrou estar relacionado com o aumento nos níveis de PCR, ferritina, IL-6, -10, -15 e -2, TNF- α e INF- γ , estando alguns destes marcadores também presentes na CRS^{5,19,33}. Entre os nomeados, a IL-6 parece ser o mais relevante – quanto mais cedo se atinge o pico máximo da concentração plasmática da IL-6, maior o risco de NTX de grau ≥ 4 ⁵.

Apesar do mecanismo subjacente aos efeitos neurológicos não ser nítido, pacientes com NTX grau ≥ 4 revelaram evidências clínicas de disfunção endotelial, destruição da parede vascular, falha capilar, coagulação intravascular disseminada, agregação plaquetar, disrupção da BHE e aumento dos níveis serológicos de substâncias responsáveis por processos de **ativação endotelial**, como a angiopoitina ANG2, fator de *Jcb:K J^YWfUbX* (VWF), IL-6, INF- γ e TNF- α ⁵. A ativação endotelial generalizada induz o **aumento da permeabilidade da BHE**, o que permite o trânsito para o SNC das citocinas plasmáticas mencionadas, de leucócitos e das próprias células CAR-T⁵. Tal é comprovado pela sua deteção no líquido cefalorraquidiano de pacientes que sucumbiram a NTX severa⁵. Uma vez no SNC, as células CAR-T secretam INF- γ e TNF- α que ativam os pericitos vasculares cerebrais a libertarem grandes quantidades de IL-6, potenciando ainda mais a ativação endotelial cerebral⁵. Este ciclo de fenómenos amplifica progressivamente a perda da integridade vascular cerebral, que evolui para a fatal **disrupção da BHE**⁵.

O tratamento estabelecido para a NTX passa, sobretudo, pela gestão da CRS através da supressão imunológica com **corcosteróides** e do controlo dos processos inflamatórios mediados pela IL-6 com o **tocilizumab**⁵. Contudo, apesar da sua efetividade na abolição da febre e da hipotensão da CRS, estes agentes não demonstraram qualquer efeito contra a NTX⁵. Não é de todo claro se a taxa de penetração do tocilizumab no SNC é suficiente para diminuir a sua exposição à IL-6⁵. Na verdade, o bloqueio do IL-6R faz aumentar, temporariamente, os seus níveis plasmáticos, o que agrava a passagem desta citocina através da BHE⁷⁶. Dado que a causa primária da NTX aparenta ser a disfunção generalizada do endotélio vascular, o ponto fulcral de atuação para o seu tratamento será a estabilização das células endoteliais⁷⁷. Estratégias inovadoras como hipertransfusão de plaquetas para aumentar os níveis de ANG1 ou remoção de plasma para depleção das citocinas plasmáticas poderão ser estudadas em modelos animais⁵. Neste momento, à falta de alternativas, a abordagem mais lógica será a prevenção através da identificação dos pacientes em risco. Por exemplo, pacientes com níveis serológicos elevados de biomarcadores de ativação endotelial - nomeadamente a proporção **ANG1: ANG2** - antes da linfodepleção, ou que apresentem co-morbilidades neurológicas pré-existentes deverão ser sujeitos a uma menor dose de células CAR-T⁵.

Por fim, à semelhança da CRS, a NTX parece ser mais incidente em imunoterapias cujo antígeno alvo é o CD19, devido ao facto destas induzirem uma expansão *in vivo* robusta das células T⁵. Outros fatores como o fácil acesso às células tumorais e o nível de expressão e a afinidade do domínio extracelular do CAR para o antígeno alvo, contribuem igualmente para as diferenças na ativação das células T observadas entre o CD19 e outros antígenos⁵.

Efeitos on-target/off-tumor

A preocupação sobre a ocorrência de efeitos *on-target/off-ti a Cf* resultantes da terapia com células CAR-T prende-se com a expressão e reconhecimento de antígenos alvo em tecidos não patogénicos²¹. O exemplo mais evidente é a aplasia B, resultante da destruição de toda a linhagem de células B CD19⁺ pelas células CAR-T anti-CD19⁷. Os efeitos *on-target/off-tumor* são, sobretudo, reportados em ensaios clínicos para o tratamento de tumores sólidos, devido à falta de antígenos alvo específicos que não estejam também presentes em células não cancerígenas⁷. Por exemplo, num ensaio clínico para a avaliação da terapia com células CAR-T específicas para o antígeno tumoral HER-2/neu, um paciente sofreu de paragem cardio-respiratória imediata e disfunção de múltiplos órgãos vitais devido à expressão concomitante do HER-2/neu nestes⁷⁸. Noutro tipo de situações, YgUtoxicidade

pode também ocorrer através da ligação do CAR a um antígeno estereoquimicamente semelhante ao antígeno alvo⁷.

Promoção da segurança *in vivo* das células CAR-T

De forma a combater a problemática da segurança das células CAR-T *in vivo* e a evitar os efeitos secundários fatais, existem inúmeras estratégias a serem desenvolvidas⁴. Uma das mais antigas foi a inclusão de **genes suicidas**⁷. As células CAR-T eram adicionalmente transduzidas com um gene codificante para um composto proteico suicida que, ao ser ativado por uma molécula exógena, desencadeava um processo apoptóticos. Como exemplo nomeia-se o sistema suicida **iCasp9**, constituído pelo gene **CASP9**, que está já validado na prática clínica⁷. Neste sistema, o **CASP9** codifica para a proteína pró-apoptótica **Caspase 9**, que é sintetizada numa forma inativa⁴. Quando há um efeito adverso que implique a destruição das células CAR-T, ocorre a administração de uma molécula exógena, que através de um processo de homodimerização ativa a proteína transgénica⁷. Apesar de serem eficazes, os sistemas suicidas são incapazes de controlar a ativação e a expansão das células CAR-T *in vivo*, não permitindo, a sua inativação gradual²³. Uma vez ativados, a sua ação é irreversível, resultando, também, na destruição de células CAR-T terapêuticas não responsáveis pelos efeitos adversos²³.

Tabela 6 - Novas estratégias para promover a segurança das células CAR-T *in vivo*

SynNotch	A ativação do SynNotch, aquando a ligação ao antígeno tumoral alvo, induz a expressão do CAR através da libertação de fatores de transcrição. A ativação e proliferação da célula T apenas ocorre com a ligação do CAR a um segundo antígeno alvo.
BiTE (anti-CD19/CD3; anti-CD20/CD3)	Moléculas bifuncionais que interagem simultâneamente com as células CAR-T (CD3) e com os antígenos alvos (CD19/CD20).
Células sCAR-T	As células CAR-T reconhecem PNEs, que ligam a um antígeno tumoral alvo (PNE-CD19/PNE-CD20). A ativação das células CAR-T ocorre através da ligação do PNE, que funciona como um antígeno alvo.

Recentemente, a criação de dispositivos para o controlo da expansão e ativação das células CAR-T *in vivo*, vai além das smart T-cells. Como exemplos podem citar-se a

expressão simultânea de CARs e **Synthetic Notch receptors** (SynNotch)^{4,7}, os **anticorpos bi-específicos** (*Bispecific T cell engager - BiTE*), que permitem redirecionar a especificidade antigénica das células CAR-T⁷⁹, e as **células sCAR-T** (*Peptide-specific switchable CART-cell*) que reconhecem **neo-epítomos peptídicos** (PNE) em vez de antígenos²³. Os detalhes podem ser consultados na Tabela 6^{4,7,23,79}.

V. O futuro das Células CAR-T

O desafio dos tumores sólidos

Apesar do benefício clínico notório em pacientes portadores de câncros hematológicos, as células CAR-T não demonstram a mesma eficácia anti-tumoral quando administradas em pacientes com tumores sólidos⁸. Os mecanismos responsáveis pelos resultados desfavoráveis não estão inteiramente elucidados, mas afirma-se que a causa é multifatorial⁸.

A primeira barreira ao tratamento de tumores sólidos traduz-se no microambiente tumoral altamente imunossupressor onde os tumores são suportados por uma matriz coesa composta por células do estroma⁸. O estroma tumoral, para além de nutrir e promover o crescimento e angiogénese tumoral, é também responsável pela regulação das funções das células T e pelo bloqueio dos agentes anti-tumorais⁸⁰. Assim, em contraste com o fácil acesso aos tumores das células B - que se encontram preferencialmente na corrente sanguínea - as células CAR-T são forçadas a migrarem para o tumor de interesse, o que requer a presença de integrinas, quimiocinas e dos respetivos recetores⁸⁰, a infiltrarem-se nesta matrix e a ligarem-se ao antígeno alvo, para que ocorra lise tumoral⁸.

Mesmo que o direcionamento e reconhecimento sejam bem sucedidos, continuam a persistir obstáculos como a depleção nutricional, stress oxidativo, pH ácido, hipoxia e a presença de citocinas e fatores solúveis (prostaglandina E2, adenosina, TGF β , IL-4 e IL-10) que suprimem a proliferação e ativação das células T⁸. Para além dos fatores químicos, o ecossistema hostil tumoral caracteriza-se, também, por conter células imunitárias imunossupressivas como **linfócitos Treg**, **macrófagos tumorais** (TAMs) e **células mieloides supressoras** (MDSCs)⁸. Recentemente, num estudo clínico reportado por Heczey *et al.* - **GRAIN** (NCT01822652) - observou-se um aumento consistente de TAMs e MDSCs na circulação periférica, em resposta à administração de células CAR-T, por processos de recrutamento tumoral³⁵. À semelhança deste, O'Rourke *et al.* (2017) - num ensaio clínico (NCT02209376) para o tratamento de glioblastoma recidivante com células CAR-T contra a variante III do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFRvIII) - constataram que, após a infusão destas, se gerou uma resposta imunossupressiva

compensatória por parte do microambiente tumoral, comprovada pelo fluxo elevado de células Treg não transduzidas que sobre-expressavam moléculas inibitórias como PD-L1 e IDO1⁷⁶. Por fim, as células T, enquanto células imunitárias, têm os seus próprios mecanismos de regulação, desde a expressão elevada dos recetores inibitórios **CTLA4** e **PD-1**, cujos ligandos se encontram *upregulated* nos tumores, mecanismos intracelulares de *feedback* negativo e morte celular programada, através da ligação entre o recetor **Fas** e o seu ligando, **FasL**, também sobre-expresso nas células tumorais⁸.

Um outro aspeto prende-se com a **heterogeneidade antigénica** tumoral⁷. A maior parte dos antígenos tumorais não é específica para um só tipo de tumor⁹ e a sua expressão não se restringe a tecidos malignos⁸⁰. Tendo em conta esta barreira, o alvo preferencial para as células CAR-T, em tumores sólidos, serão os **neoantígenos** - peptídeos resultantes da expressão de mutações genómicas típicas das células cancerígenas⁸⁰. Os neoantígenos são, no fundo, alvos individualizados e específicos para um tumor, que não são expressos pelas células *bystander* não cancerígenas⁸.

Apesar do sucesso das células CAR-T nos cancros hematológicos não se extrapolar para o tratamento de tumores sólidos, o número de ensaios clínicos neste campo é cada vez maior⁸. Os antígenos que atualmente se encontram em investigação clínica e pré-clínica são: o CEA, a mesotelina, a molécula de adesão LICAM³¹, o disialogangliósido GD2⁷⁷, o IL-13R α 2⁵⁷ e o EGFRvIII⁷⁶.

Vários autores referem que uma das formas de contornar a resposta imunossupressiva tumoral poderá traduzir-se na combinação terapêutica entre células CAR-T e anticorpos monoclonais inibidores dos *checkpoints* imunitários, como os antagonistas do **PD-1**, **PD-L1** e **CTLA-4**^{7,77}. Indo mais além, a sinergia entre as duas vias imunoterapêuticas poderá ser usada para controlar, no espaço e no tempo, a terapia com células CAR-T⁴. No entanto, a realidade da prática clínica pode não corresponder de todo à teoria. No ensaio clínico realizado por Heczey *et al.*, já mencionado (NCT01822652), conjugou-se um CAR anti-GD2 de terceira geração com um agente inibidor do PD-1 e, surpreendentemente, não houve alterações significativas na expansão e a persistência das células CAR-T³⁵.

Designs do futuro - o SUPRA CAR

Atualmente, a maioria dos CARs utilizados na prática clínica são modelos fixos em que o motivo extracelular (scFv) tem uma composição constante e reconhece um antígeno alvo pré-definido através da ligação CAR - antígeno, com a consequente ativação dos domínios intracelulares⁹. Este mecanismo estático dificulta o controlo da ativação das células CAR-T,

impedindo a gestão dos efeitos secundários que lhe são característicos⁹. Para além deste facto, a fim de melhorar a especificidade das células CAR-T preferem-se, na maioria das vezes, scFvs de alta afinidade. Contudo, a elevada afinidade dos CARs dificulta a discriminação da densidade antigénica da célula cancerígena, o que leva à morte de células não patogénicas que expressem baixos níveis do antígeno alvo⁹. Já scFvs de baixa afinidade, permitem uma melhor distinção da densidade antigénica, mas podem diminuir a especificidade do CAR⁹. Desta forma, *designs* de CARs fixos comprometem quer o controlo da ativação, quer a especificidade das células CAR-T⁹.

A fim de programar e aumentar a especificidade e a segurança dos CARs num só sistema, o grupo Cho *et al.* criou o sistema universal **SUPRA** (*Split, Universal, Programmable*) **CAR**⁹. A sua estrutura divide-se em dois componentes principais - o recetor universal **zipCAR**, resultante da fusão entre os domínios intracelulares e o domínio extracelular constituído por um **zipper de leucina**, e um domínio **zipFv**, composto por uma cadeia de reconhecimento scFv ligada a um **zipper de leucina complementar** ao anterior⁹. Após reconhecimento do antígeno alvo, pela cadeia scFv, ocorre a ligação entre zipFv e o zipCAR, através da complementaridade entre os dois *zipper*s de leucina, resultando na ativação da célula CAR-T⁹.

Ao contrário das conceções convencionais, o sistema SUPRA Universal permite o direcionamento da atividade anti-tumoral das células CAR-T a vários antígenos alvo, sem necessidade de modificações genéticas adicionais nas células dos pacientes⁹. As células T são apenas manipuladas de forma a expressarem o zipCAR, sendo que o recetor zipFv é adicionado como um agente exógeno, permitindo variar a afinidade antigénica das células CAR-T⁹. Esta vantagem permite combater falhas terapêuticas por perda ou por *downregulation* do antígeno alvo nas células tumorais, evitando a ocorrência de relapsos à terapia com células CAR-T⁹. Outro aspeto prende-se com o facto dos dois *zipper*s de leucina terem afinidades variáveis e controláveis o que possibilita a regulação, perante o reconhecimento do antígeno alvo, das várias vias de sinalização intracelulares, dos tipos de resposta imunitária desencadeados e da ativação diferencial dos vários fenótipos de células T⁹. Assim, o SUPRA CAR apresenta-se como um sistema de controlo generalizado e complexo que modula a atividade imunitária das células CAR-T, adequando cada resposta a cada situação patológica⁹.

Dever-se-á realçar que o propósito final da criação desta plataforma flexível de reconhecimento multi-antigénico consiste na diminuição dos efeitos secundários fatais associados às células CAR-T, nomeadamente a CRS e a NTX⁹.

VI. Conclusão

As células CAR-T constituem uma das terapêuticas mais inovadoras, no âmbito da imuno-oncologia, dos últimos anos. A conversão de organismos vivos (células), capazes de gerar respostas biológicas, em plataformas terapêuticas e a sua manipulação genética, a fim de reprogramar os comportamentos celulares, justifica o caráter revolucionário desta imunoterapia perante as terapias anti-cancerígenas convencionais⁷. De facto, o sucesso das células CAR-T, principalmente das células CAR-T anti-CD19, tem sido claramente comprovado pelos resultados positivos obtidos, em diversos ensaios clínicos, para o tratamento de cânceres hematológicos CD19⁺. A aprovação em 2017, pela FDA, de dois produtos contendo esta tecnologia - **KYMRIA**[®] da Novartis, para o tratamento de r/r B-ALL e de B-NHL (a partir do dia 1 de maio deste ano) e **YESCARTA**[®] da Kite Pharma, para o tratamento de r/r B-NHL - enriqueceu o mercado farmacêutico oncológico e motivou outras empresas biotecnológicas - Mustang Bio, Juno Therapeutics, Celyad, Cellectis, entre outras - a investirem no seu *pipeline* imunoterapêutico, procurando novos antígenos alvo.

Porém, o otimismo perante a eficácia e o benefício clínico destas terapias é ensombrado pelos seus efeitos tóxicos característicos - a CRS e a NTX - que limitam o sucesso terapêutico. Apesar dos mecanismos fisiopatológicos não estarem, ainda, esclarecidos, os resultados obtidos indicam que a sua ocorrência está interligada, sendo que pacientes com CRS severa apresentaram, posteriormente, NTX igualmente severa. Recentemente, um estudo conduzido por Norelli *et al.* (2018) revelou que a libertação de IL-1 pelos monócitos circulantes pró-inflamatórios poderá ser o fator desencadeante da CRS (e da NTX posterior), contrariamente à hipótese atual da produção de grandes quantidades de IL-6 pelas células CAR-T ativadas⁶. Na sequência desta descoberta, o mesmo estudo comprova a eficácia do antagonista do recetor da IL-1, anakinra, na abolição da CRS e na prevenção da NTX, o que poderá constituir uma alternativa à terapia com o tocilizumab⁶. Já a causa da NTX, segundo GUST *et al.* (2017), está relacionada com a ativação das células endoteliais vasculares cerebrais, que, ao promover o aumento da permeabilidade da BHE, leva consequentemente, à disrupção da mesma⁵. Torna-se claro que a descoberta das características patológicas, dos fatores de risco, de possíveis biomarcadores e dos mecanismos subjacentes a ambos os efeitos, é fulcral para gerir a toxicidade associada às células CAR-T.

Por outro lado, o sucesso clínico destas terapias para o tratamento de tumores sólidos é difícil de atingir. Para além dos aspetos relacionados com o microambiente tumoral altamente imonossupressor, fatores como a heterogeneidade da expressão antigénica, a

expressão dos antígenos tumorais em células não patogênicas e os próprios mecanismos de regulação das células T, tornam a eficácia das células CAR-T bastante reduzida⁸. Apesar do panorama negativo, a investigação clínica neste campo continua, havendo um conjunto considerável de antígenos alvo em estudo para o tratamento de diversos tipos de cânceres sólidos^{31,57,76}.

Sem dúvida que o caminho a percorrer pelas células CAR-T é árduo e longo. Os desafios a superar englobam não só a gestão da toxicidade e promoção da segurança *in vivo*, como também a expansão a outros campos oncológicos e a acessibilidade à prática clínica. Desta forma, o foco atual reside na procura de novas estratégias que permitam o controlo *in vivo* das células CAR-T, sem reduzir a sua atividade anti-tumoral e persistência^{4,7}. Surge, neste âmbito, a mais recente inovação em *CAR design* - o SUPRA CAR. Este novo sistema, criado por CHO *et al.* (2018), é passível de ser controlado para modular a atividade imunitária das células CAR-T, com vista à diminuição da sua toxicidade. Com este avanço, esta terapia poderá tornar-se numa imunoterapia anti-cancerígena ideal, capaz de ser adaptada a cada tipo de cancro, com uma atividade *in vivo* segura.

VII. Bibliografia

1. HARTMANN, J., SCHÜBLER-LENZ, M., BONDANZA, A., BUCHHOLZ, C. J. - **Clinical development of CAR T cells - Challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts.** *EMBO Mol. Med.* 9, (2017) 1183–1197.
2. NOVARTIS - **Novartis receives first ever FDA approval for a CAR-T cell therapy, Kymriah (TM) (CTL019), for children and young adults with B-cell ALL that is refractory or has relapsed at least twice.** [Acedido a 24 de junho de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-receives-first-ever-fda-approval-car-t-cell-therapy-kymriahtm-ctl019>
3. U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - **Approval Letter - YESCARTA®.** [Acedido a 26 de junho de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM581259.pdf>
4. ZHANG, E., XU, H. - **A new insight in chimeric antigen receptor-engineered T cells for cancer immunotherapy.** *J. Hematol. Oncol.* 10, (2017) 1–11.
5. GUST, J., HAY, K. A., HANAFI, L. A., LI, D., MYERSON, D., GONZALEZ-CUYAR, L. F., YEUNG, C., LILES, W. C., WURFEL, M., LOPEZ, J. A., CHEN, J., CHUNG, D., BAKER, S. H., OZPOLAT, T., FINK, K. R., RIDDELL, S. R., MALONEY, D. G., TURTLE, C. J. - **Endothelial activation and blood–brain barrier disruption in neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CD19 CAR-T cells.** *Cancer Discov.* 7, (2017) 1404–1419.
6. NORELLI, M., CAMISA, B., BARBIERA, G., FALCONE, L., PUREVDORJ, A., GENUA, M., SANVITO, F., PONZONI, M., DOGLIONI, C., CRISTOFORI, P., TRAVERSARI, C., BORDIGNON, C., CICERI, F., OSTUNI, R., BONINI, C., CASUCCI, M., BONDANZA, A. - **Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells.** *Nat. Med.* 24, (2018) 739–748
7. LIM, W. A., JUNE, C. H. - **The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer.** *Cell* 168, (2017) 724–740.
8. NEWICK, K., MOON, E., ALBELDA, S. M. - **Chimeric antigen receptor T-cell therapy for solid tumors.** *Mol. Ther. - Oncolytics* 3, (2016) 1–6.
9. CHO, J. H., COLLINS, J. J., WONG, W. W. - **Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses.** *Cell* (2018) 1–13.
10. ASCIERTO, P. A., ADDEO, R., CARTENI, G., DANIELE, B., DE LAURENTIS, M. D., IANNIELLO, G. PIETRO, MORABITO, A., PALMIERI, G., PEPE, S., PERRONE, F., PIGNATA, S.,

- MONTESARCHIO, V. - **The role of immunotherapy in solid tumors: Report from the Campania Society of Oncology Immunotherapy (SCITO) meeting, Naples 2014.** *J. Transl. Med.* 12, (2014) 1–15.
11. ROSENBERG, S. A., RESTIFO, N. P., YANG, J. C., MORGAN, R. A., DUDLEY, M. E. - **Adoptive cell transfer: A clinical path to effective cancer immunotherapy.** *Nature Reviews Cancer* 8, (2008) 299–308.
 12. U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - **BLA 125646 Tisagenlecleucel. Novartis Pharmaceuticals Corporation.** [Acedido a 24 de junho de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/OncologicDrugsAdvisoryCommittee/UCM566166.pdf>
 13. BRENJENS, R., DAVILA, M. L., RIVIERE, I., WANG, X., BARTIDO, S., PARK, J., CURRAN, K., CHUNG, S. S., STEFANSKI, J., BORQUEZ-OJEDA, O., OLSZEWSKA, M., QU, J., WASIELEWSKA, T., HE, Q., FINK, M., SHINGLOT, H., YOUSSEF, M., SATTER, M., WANG, Y., HOSEY, J., QUINTANILLA, H., HALTON, E., BERNAL, Y., BOUHASSIRA, D. C. G., ARCILA, M. E., GONEN, M., ROBOZ, G. J., MASLAK, P., DOUER, D., FRATTINI, M. G., GIRALT, S., SADELAIN, M. - **Efficacy and Toxicity Management of 19-28z CAR T Cell Therapy in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia.** *Sci. Transl. Med.* 6, (2014) 295–296.
 14. FITZGERALD, J. C., WEISS, S. L., MAUDE, S. L., BARRETT, D. M., LACEY, S. F., MELENHORST, J. J., SHAW, P., BERG, R. A., JUNE, C. H., PORTER, D. L., FREY, N. V., GRUPP, S. A., TEACHEY, D. T. - **Cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor T cell therapy for acute lymphoblastic leukemia.** *Crit. Care Med.* 45, (2017) 124–131.
 15. CHMIELEWSKI, M., ABKEN, H. - **TRUCKs: the fourth generation of CARs.** *Expert Opin. Biol. Ther.* 15, (2015) 1145–1154.
 16. EUR-LEX - **Regulamento (CE) nº 1394/2007 do Parlamento Europeu e do Conselho de 13 de Novembro de 2007.** [Acedido a 4 de junho de 2018]. Disponível na Internet: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007R1394&from=PT>
 17. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Advanced therapy medicinal products.** [Acedido a 4 de junho de 2018]. Disponível na Internet: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000294.jsp&mid=WC0b01ac05800241e0
 18. LEE, D. W., KOCHENDERFER, J. N., STETLER-STEVENSON, M. C., YONGZHI, K., DELBROOK, C., FELDMAN, S. A., FRY, T. J., ORENTAS, R., SABATINO, M., SHAH, N. N., STEINBERG, S. M., STRONCEK, D., TSCHERNIA, N., YUAN, C., ZHANG, H.,

- ZHANG, L., ROSENBERG, S. A., WAYNE, A. S., MACKALL, C. L. - **T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: A phase I dose-escalation trial.** *Lancet* 385, (2015) 517–528.
19. SCHUSTER, S. J., SVOBODA, J., CHONG, E. A., NASTA, S. D., MATO, A. R., ANAK, Ö., BROGDON, J. L., PRUTEANU-MALINICI, I., BHOJ, V., LANDSBURG, D., WASIK, M., LEVINE, B. L., LACEY, S. F., MELENHORST, J. J., PORTER, D. L., JUNE, C. H. - **Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas.** *N. Engl. J. Med.* (2017) 1–10
20. ZHAO, Z., CONDOMINES, M., VAN DER STEGEN, S. J. C., PERNA, F., KLOSS, C. C., GUNSET, G., PLOTKIN, J., SADELAIN, M. - **Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells.** *Cancer Cell* 28, (2015) 415–428.
21. BONIFANT, C. L., JACKSON, H. J., BRENTJENS, R. J., CURRAN, K. J. - **Toxicity and management in CAR T-cell therapy.** *Mol. Ther. - Oncolytics* 3, (2016) 1–6.
22. LIU, J., ZHONG, J. F., ZHANG, X., ZHANG, C. **Allogeneic CD19-CAR-T cell infusion after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in B cell malignancies.** *J. Hematol. Oncol.* 10, (2017) 2–8.
23. RODGERS, D. T., MAZAGOVA, M., HAMPTON, E. N., CAO, Y., RAMADOSS, N. S., HARDY, I. R., SCHULMAN, A., DU, J., WANG, F., SINGER, O., MA, J., NUNEZ, V., SHEN, J., WOODS, A. K., WRIGHT, T. M., SCHULTZ, P. G., KIM, C. H., YOUNG, T. S. - **Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, (2016) E459–E468.
24. STRONCEK, D. F., LEE, D. W., REN, J., SABATINO, M., HIGHFILL, S., KHUU, H., SHAH, N. N., KAPLAN, R. N., FRY, T. J., MACKALL, C. L. - **Elutriated lymphocytes for manufacturing chimeric antigen receptor T cells.** *J. Transl. Med.* 15, (2017) 4–11.
25. DAI, H., ZHANG, W., LI, X., HAN, Q., GUO, Y., ZHANG, Y., WANG, Y., WANG, C., SHI, F., ZHANG, Y., CHEN, M., FENG, K., WANG, Q., ZHU, H., FU, X., LI, S., HAN, W. - **Tolerance and efficacy of autologous or donor-derived T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors in adult B-ALL with extramedullary leukemia.** *Oncoimmunology* 4, (2015) 1–49.
26. GUO, B., CHEN, M., HAN, Q., HUI, F., DAI, H., ZHANG, W., ZHANG, Y., WANG, Y., ZHU, H., HAN, W. - **CD138-directed adoptive immunotherapy of chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells for multiple myeloma.** *J. Cell. Immunother.* 2, (2016) 28–35.

27. LIAO, W., LIN, J., LEONARD, W. J. - **IL-2 Family Cytokines: New Insights into the Complex Roles of IL-2 as a Broad Regulator of T helper Cell Differentiation.** *Curr Opin Immunol.* 23, (2012) 1–12.
28. KERSHAW, M. H., WESTWOOD, J. A., PARKER, L. L., WANG, G., ESHHAR, Z., MAVROUKAKIS, S. A., WHITE, D. E., WUNDERLICH, J. R., CANEVARI, S., ROGERS-FREEZER, L., CHEN, C. C., YANG, J. C., ROSENBERG, S. A. and HWU, P. - **A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer.** *Clin. Cancer Res.* 12, (2006) 6106–6115.
29. KOCHENDERFER, J. N., WILSON, W. H., JANIK, J. E., DUDLEY, M. E., STETLER-STEVENSON, M., FELDMAN, S. A., MARIC, I., RAFFELD, M., NATHAN, D. A. N., LANIER, B. J., MORGAN, R. A., ROSENBERG, S. A. - **Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19.** *Blood* 116, (2010) 4099–4102.
30. KOCHENDERFER, J. N., DUDLEY, M. E., KASSIM, S. H., SOMERVILLE, R. P.T., CARPENTER, R. O., MARYALICE, S. S., YANG, J. C., PHAN, G. Q., HUGHES, M. S., SHERRY, R. M., RAFFELD, M., FELDMAN, S., LU, L., LI, Y. F., NGO, L. T., GOY, A., FELDMAN, T., SPANER, D. E., WANG, M. L., CHEN, C. C., KRANICK, S. M., NATH, A., NATHAN, D. A. N., MORTON, K. E., TOOMEY, M. A., ROSENBERG, S. A. - **Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor.** *J. Clin. Oncol.* 33, (2015) 540–549.
31. JACKSON, H. J., RAFIQ, S., BRENTJENS, R. J. - **Driving CAR T-cells forward.** *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 13, (2016) 370–383.
32. FRY, T. J., SHAH, N. N., ORENTAS, R. J., STETLER-STEVENSON, M., YUAN, C. M., RAMAKRISHNA, S., WOLTERS, P., MARTIN, S., DELBROOK, C., YATES, B., SHALABI, H., FOUNTAINE, T. J., SHERN, J. F., MAJZNER, R. G., STRONCEK, D. F., SABATINO, M., FENG, Y., DIMITROV, D. S., ZHANG, L., NGUYEN, S., QIN, H., DROPULIC, B., LEE, D. W. - **CD22-targeted CAR T cells induce remission in CD19- CAR naive or resistant B-ALL.** *Nat. Med.* 24, (2018) 20–28.
33. NEELAPU, S. S. LOCKE, F. L., BARTLETT, N. L., LEKAKIS, L. J., MIKLOS, D. B., JACOBSON, C. A., BRAUNSCHWEIG, I., OLUWOLE, O. O., SIDDIQI, T., LIN, Y., TIMMERMAN, J. M., STIFF, P. J., FRIEDBERG, J. W., FLINN, I. W., GOY, A., HILL, B. T., SMITH, M. R., DEOL, A., FAROOQ, U., MCSWEENEY, P., MUNOZ, J., AVIVI, I., CASTRO, J. E., WESTIN, J. R., CHAVEZ, J. C., GHOBADI, A., KOMANDURI, K. V.,

- LEVY, R., JACOBSEN, E. D., WITZIG, T. E., REAGAN, P., BOT, A., ROSSI, J., NAVALE, L., JIANG, Y., AYCOCK, J., ELIAS, M., CHANG, D., WIEZOREK, J., GO, W. Y. - **Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma**. *N. Engl. J. Med.* (2017) 1–14.
34. BRENTJENS, R. J., RIVIÈRE, I., PARK, J. H., DAVILA, M. L., WANG, X., STEFANSKI, J., TAYLOR, C., YEH, R., BARTIDO, S., BORQUEZ-OJEDA, O. O., MALGORZATA, B. Y., PEGRAM, H., PRZYBYLOWSKI, M., HOLLYMAN, D., USACHENKO, Y., PIRRAGLIA, D., HOSEY, J., SANTOS, E., HALTON, E., MASLAK, P., SCHEINBERG, D., JURCIC, J., HEANEY, M., HELLER, G., FRATTINI, M., SADELAIN, M. - **Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias**. *Blood* 118, (2011) 4817–4828.
35. HECZEY, A., LOUIS, C. U., SAVOLDO, B., DAKHOVA, O., DURETT, A., GRILLEY, B., LIU, H., WU, M. F., MEI, Z., GEE, A., MEHTA, B., ZHANG, H., MAHMOOD, N., TASHIRO, H., HESLOP, H. E., DOTTI, G., ROONEY, C. M., BRENNER, M. K. - **CAR T Cells Administered in Combination with Lymphodepletion and PD-1 Inhibition to Patients with Neuroblastoma**. *Mol. Ther.* 25, (2017) 2214–2224.
36. QASIM, W., ZHAN, H., SAMARASINGHE, S., ADAMS, S., AMROLIA, P., STAFFORD, S., BUTLER, K., RIVAT, C., WRIGHT, G., SOMANA, K., GHORASHIAN, S., PINNER, D., AHSAN, G., GILMOUR, K., LUCCHINI, G., INGLOTT, S., MIFSUD, W., CHIESA, R., PEGGS, K. S., CHAN, L., FARZENEH, F., THRASHER, A. J., VORA, A., PULE, M., VEYS, P. - **Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells**. *Sci. Transl. Med.* 9, (2017) 1–9.
37. NOVARTIS - **The KYMRIAH Experience**. [Acedido a 24 de junho de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.hcp.novartis.com/globalassets/products70/kymriah-full-site/ped-all/hcp-resources/kymriah-pall-manufacturing-brochure-digital.pdf>
38. MAUDE, S. L., LAETSCH, T. W., BUECHNER, J., RIVES, S., BOYER, M., BITTENCOURT, H., BADER, P., VERNERIS, M. R., STEFANSKI, H. E., MYERS, G. D., QAYED, M., DE MOERLOOSE, B., HIRAMATSU, H., SCHLIS, K., DAVIS, K. L., MARTIN, P. L., NEMECEK, E. R., YANIK, G. A., PETERS, C., BARUCHEL, A., BOISSEL, N., MECHINAUD, F., BALDUZZI, A., KRUEGER, J., JUNE, C. H., LEVINE, B. L., WOOD, P., TARAN, T., LEUNG, M., MUELLER, K. T., ZHANG, Y., SEN, K., LEBWOHL, D., PULSIPHER, M. A., GRUPP, S. A. - **Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia**. *N. Engl. J. Med.* 378, (2018) 439–448.

39. DANIEL, E. - **Novartis gains second FDA approval for CAR T-cell therapy Kymriah.** [Acedido a 28 de junho de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.pharmaceutical-technology.com/news/novartis-fda-approval-kymriah/>
40. NOVARTIS - **Kymriah® (tisagenlecleucel), first-in-class CAR-T therapy from Novartis, receives second FDA approval to treat appropriate r/r patients with large B-cell lymphoma.** [Acedido a 28 de junho de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.novartis.com/news/media-releases/kymriah-r-tisagenlecleucel-first-class-car-t-therapy-from-novartis-receives-second-fda-approval-treat-appropriate-rr-patients-large-b-cell-lymphoma>
41. NOVARTIS – **CTR_CCTL019C2201_Final Results.** [Acedido a 28 de junho de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.novctrd.com/CtrdWeb/displaypdf.nov?trialresultid=17135>
42. GILEAD - **Gilead Sciences Completes Acquisition of Kite Pharma, Inc.** [Acedido a 26 de junho de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.gilead.com/news/press-releases/2017/10/gilead-sciences-completes-acquisition-of-kite-pharma-inc>
43. KITE, A GILEAD COMPANY - **Pipeline.** [Acedido a 26 de junho de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.kitepharma.com/our-research/pipeline/>
44. CELLECTIS - **Our story.** [Acedido a 5 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.cellectis.com/en/our-story/>
45. CELLECTIS - **TALEN®.** [Acedido a 5 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.cellectis.com/en/research/talen/>
46. SUN, N., ZHAO, H. - **Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing.** *Biotechnol. Bioeng.* 110, (2013) 1811–1821.
47. CELLECTIS - **Main product candidates.** [Acedido a 5 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.cellectis.com/en/products/product-candidates/>
48. CELLECTIS - **Universal Chimeric Antigen Rceptors.** [Acedido a 5 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.cellectis.com/products/ucarts>
49. CELLECTIS - **Preliminary data from Servier and Pfizer’s UCART19 product candidate shows high complete remission rate across two phase I adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia trials.** [Acedido a 5 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.cellectis.com/en/press/preliminary-data-from-servier-and-pfizers-ucart19-product-candidate-shows-high-complete-remission-rate-across-two-phase-i-adult-and-pediatric-acute-lymphoblastic-leukemia-trials>

50. JUNO THERAPEUTICS, A CELGENE COMPANY - **Our story**. [Acedido a 3 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.junotherapeutics.com/about-us/our-story/>
51. CELGENE - **PRESS RELEASE: Celgene Corporation to Acquire Juno Therapeutics, Inc.**. [Acedido a 3 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.celgene.com/newsroom/cellular-immunotherapies/celgene-corporation-to-acquire-juno-therapeutics-inc/>
52. JUNO THERAPEUTICS, A CELGENE COMPANY - **Our pipeline**. [Acedido a 3 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.junotherapeutics.com/our-pipeline/>
53. MUSTANG BIO - **Fortress Biotech announces that its subsidiary, Mustang Bio, enters into license agreements with City of Hope for novel CAR-T immunotherapies**. [Acedido a 29 de junho de 2018]. Disponível na Internet: <http://mustangbio.com/fortress-biotech-announces-that-its-subsi-dary-mustang-bio-enters-into-license-agreements-with-city-of-hope-for-novel-car-t-immunotherapies/>
54. MUSTANG BIO - **About us**. [Acedido a 29 de junho de 2018]. Disponível na Internet: <http://mustangbio.com/about-us/>
55. MUSTANG BIO - **Pipeline**. [Acedido a 29 de junho de 2018]. Disponível na Internet: <http://mustangbio.com/pipeline/>
56. MUSTANG BIO - **Clinical Trials**. [Acedido a 29 de junho de 2018]. Disponível na Internet: <http://mustangbio.com/clinical-trials/>
57. BROWN, C. E., ALIZADEH, D., STARR, R., WENG, L., WAGNER, J. R., NARANJO, A., OSTBERG, J. R., BLANCHARD, M. S., KILPATRICK, J., SIMPSON, J., KURIEN, A., PRICEMAN, S. J., WANG, X., HARSHBARGER, T. L., D'APUZZO, M., RESSLER, J. A., JENSEN, M. C., BARISH, M. E., CHEN, M., PORTNOW, J., FORMAN, S. J., BADIE, B. - **Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy**. *N. Engl. J. Med.* 375, (2016) 2561–2569.
58. TC BIOPHARM - **Our Platforms**. [Acedido a 1 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.tcbiopharm.com>
59. TC BIOPHARM - **Products**. [Acedido a 1 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.tcbiopharm.com/index.php/pages>
60. EBERL, M., HAYDAY, A. - **Gamma Delta T Cells**. *Viral Immunol.* 28, (2015) 191–191.
61. TC BIOPHARM - **TC Biopharm Announces Strategic Collaboration with bluebird bio**. [Acedido a 1 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.tcbiopharm.com/index.php/component/content/article/83>

62. BLUE BIRD BIO - **Overview**. [Acedido a 2 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <http://investor.bluebirdbio.com>
63. BLUE BIRD BIO - **Our Company**. [Acedido a 2 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.bluebirdbio.com/collaborations/#celgene>
64. BLUE BIRD BIO - **Our Focus**. [Acedido a 2 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.bluebirdbio.com/our-focus/#pipeline-image>
65. RESEARCH ONCOLOGY - **bb2121 - Anti-BCMA CAR T**. [Acedido a 2 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.researchoncology.com/translational-research/bb2121-car-t/>
66. RESEARCH ONCOLOGY - **Clinical Trials**. [Acedido a 2 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.researchoncology.com/clinical-trials/>
67. SORRENTO THERAPEUTICS - **Company**. [Acedido a 2 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <http://sorrentotherapeutics.com/company/>
68. SORRENTO THERAPEUTICS - **Upcoming Milestones**. [Acedido a 2 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <http://sorrentotherapeutics.com/pipeline/>
69. CLINICALTRIALS.GOV – Home. [Em linha]. [Acedido a 2 de julho de 2018] Disponível na Internet: <https://clinicaltrials.gov/>
70. CELYAD - **About Celyad**. [Acedido a 3 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.celyad.com/en/about-celyad>
71. CELYAD - **CYAD-01 (CAR-T NKG2D) Product Candidate**. [Acedido a 3 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.celyad.com/en/our-science/immuno-oncology/for-scientists/technology-developed-at-celyad-1>
72. LANIER, L. L. - **DAPI0- and DAPI2-associated receptors in innate immunity**. *Immunol. Rev.* 227, (2009) 150–160.
73. CELYAD - **Our Pipeline**. [Acedido a 3 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.celyad.com/en/our-pipeline>
74. DEFRANCESCO, L. - **CAR-T's forge ahead, despite Juno deaths**. *Nat. Biotechnol.* 35, (2017) 6–7.
75. GILBERT, M. J. - **Severe neurotoxicity in the phase 2 trial of JCAR015 in adult B-ALL (ROCKET Study): analysis of patient, protocol and product attributes**. In: Annual Meeting and Pre-Conference Programs of the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC 2017), 32, Part One National Harbor, MD, USA. 8-12 November 2017. [Acedido a 3 de julho de 2018]. Disponível na Internet: rt-2017-SITC-Annual-Meeting-Oral-Plenary-Presentation_FINAL.pdf

76. O'ROURKE, D. M., NASRALLAH, M. P., DESAI, A., MELENHORST, J. J., MANSFIELD, K., MORRISSETTE, J. J.D., MARTINEZ-LAGE, M., BREM, S., MALONEY, E., SHEN, A., ISAACS, R., MOHAN, S., PLESA, G., LACEY, S. F., NAVENOT, J. M., ZHENG, Z., LEVINE, B. L., OKADA, H., JUNE, C. H., BROGDON, J. L., MAUS, M. V. - **A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma.** *Sci. Transl. Med.* 9, (2017).
77. MOUNT, C. W., MAJZNER, R. G., SUNDARESH, S., ARNOLD, E. P., KADAPAKKAM, M., HAILE, S., LABANIEH, L., HULLEMAN, E., WOO, P. J., RIETBERG, S. P., VOGEL, H., MONJE, M., MACKALL, C. L. - **Potent antitumor efficacy of anti-GD2 CAR T cells in H3-K27M+ diffuse midline gliomas.** *Nat. Med.* (2018).
78. MORGAN, R. A., YANG, J. C., KITANO, M., DUDLEY, M. E., LAURENCOT, C. M. and ROSENBERG, S. A. - **Case report of a serious adverse event following the administration of t cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2.** *Mol. Ther.* 18, (2010) 843–851.
79. KIM, M. S., MA, J. S. Y., YUN, H., CAO, Y., KIM, J. Y., CHI, V., WANG, D., WOODS, A., SHERWOOD, L., CABALLERO, D., GONZALEZ, J., SCHULTZ, P. G., YOUNG, T. S., KIM, C. H. - **Redirection of genetically engineered CAR-T cells using bifunctional small molecules.** *J. Am. Chem. Soc.* 137, (2015) 2832–2835.
80. GUO, Y., WANG, Y., HAN, W. - **Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for Solid Tumors: Challenges and Prospects.** *J. Immunol. Res.* 2016, (2016) 1–11.