



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Mariana Carvalho Cupido

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Imunoterapia do cancro: os macrófagos e os CAR-Ms” referentes à Unidade Curricular “Estágio” sob a orientação do Dr. Jorge Venâncio Branco, do Dr. João Tibério Peniche e do Professor Doutor João Nuno Moreira, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2021



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Mariana Carvalho Cupido

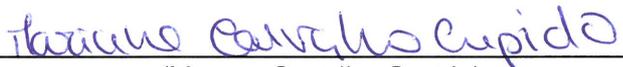
Relatórios de Estágio e Monografia intitulada "Imunoterapia do cancro: os macrófagos e os CAR-Ms" referentes à Unidade Curricular "Estágio" sob a orientação do Dr. Jorge Venâncio Branco, do Dr. João Tibério Peniche e do Professor Doutor João Nuno Moreira, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2021

Eu, Mariana Carvalho Cupido, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2016230824, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada "Imunoterapia do cancro: os macrófagos e os CAR-Ms" 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, 21 de setembro de 2021.


Mariana Carvalho Cupido
(Mariana Carvalho Cupido)

Agradecimentos

Finalizada a redação do documento único, reconheço que esta não se resumiu a uns meses de escrita. Foi sim, resultado do culminar de cinco anos de aprendizagens profissionais e pessoais. Por isso cabe-me agradecer a todos os docentes da FFUC, pela transmissão de conhecimento e por me inculcaram que este não é o fim, mas apenas a base para o meu desenvolvimento profissional, em especial ao Professor Doutor João Nuno Moreira, pelo voto de confiança, paciência, profissionalismo e disponibilidade.

À minha família pelo apoio incondicional. À minha mãe, por ser a minha melhor amiga, minha grande confidente e por me permitir sonhar. Ao meu pai por me alertar para a dureza da realidade e não deixar que a vida me desiluda. Ao avô Kiko por despertar em mim o gosto pelo saber e ainda hoje me fazer perguntas às quais não sei responder, à avó Lita por ser uma força da natureza que me inspira. Ao Bruno por fazer de mim uma pessoa melhor.

A toda a equipa da Farmácia Ygeia, pelo carinho com que me receberam e por me mostrarem o que é efetivamente trabalhar em equipa. Ao Dr. Jorge pela paciência, exigência e acompanhamento, por me inculcaram o primar pela qualidade. À Dra. Andreia por todo o apoio, bondade e por me ensinar o verdadeiro significado de “ser farmacêutico”. À Paula Branca pelo instinto maternal, à Inês por me ensinar o verdadeiro significado de colega, à Adélia pela sua brandura, à Anabela pelas palavras amigas, à Maria por me fazer rir e à Fernanda pela delicadeza e ternura.

A todo o departamento de *Marketing* do Grupo Tecnimede, em particular, ao Dr. João Tibério por me mostrar o que é um verdadeiro líder, à Dra. Filipa Matos Ferreira por todo o carinho e por me ter ensinado o real sentido de organização, à Dra. Ana Rita Simões e à Dra. Sónia Dias, por me fazerem sentir parte da equipa, ao Dr. Rafael Duarte pela preocupação e apoio constantes. A todos os antigos estudantes da FFUC agora colaboradores, que facilitaram enormemente o meu enquadramento nesta organização.

A todos os meus amigos, pelo auxílio constante em todos os meus passos. De forma concreta, à Maria João, minha madrinha de curso, por esclarecer todas as minhas dúvidas no decorrer da escrita deste documento.

Em especial, à minha irmã, que já é para mim um motivo de orgulho. Para que se inspire, e dê o seu melhor todos os dias, quer durante o seu percurso na FFUC, quer na sua vida.

Obrigada a todos!!

Resumo

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) integra um robusto plano de estudos. São cinco anos de intensa aprendizagem que culminam na realização de um estágio curricular e escrita de um documento único.

O estágio curricular é obrigatoriamente composto por um período em farmácia comunitária, podendo ou não ser associado a outro estágio, tendo eu optado pela realização de dois. Entre 11 de janeiro e 26 de abril, na Farmácia Ygeia, sob orientação do Dr. Jorge Branco. No período de 7 de maio a 31 de julho no Grupo Tecnimede, sob orientação do Dr. João Tibério e tutoria da Dra. Filipa Matos Ferreira. Neste contexto, escrevi dois relatórios de estágio, que consistem basicamente numa análise SWOT.

A monografia "Imunoterapia do cancro: os macrófagos e os CAR-Ms" aborda um tema extremamente atual, a imunoterapia, especificamente realizada com CAR-Ms, que têm capacidade de direcionar a atividade antitumoral dos macrófagos para antigénios tumorais. O objetivo desta monografia é perceber em que consiste esta terapêutica e em que medida pode vir a ser usada como futuro tratamento do cancro.

Palavras-chave: FFUC, MICF, Imunoterapia, CAR, Tumores Sólidos, Plasticidade Funcional, Macrófagos, CAR-M.

Abstract

The Integrated Master's Degree in Pharmaceutical Sciences (MICF) at the Pharmacy Faculty, University of Coimbra (FFUC) consists of a robust study plan, it is five years of intense learning that culminate in the completion of a curricular internship and the writing of a single document.

The Curricular Internship is mandatory composed of a period in community pharmacy, and can be associated or not with another internship, and I have chosen to do two. Between January 11 and April 26 at Farmácia Ygeia, under the guidance of Dr. Jorge Branco, and from May 7 to August 9 at Tecnimede Group, under the guidance of Dr. João Tibério and mentoring of Dra. Filipa Matos Ferreira. In this context, I wrote two internship reports, which basically consist of a SWOT analysis.

The review on "Immunotherapy of cancer: macrophages and CAR-Ms" addresses an extremely current topic, immunotherapy, specifically, carried out with CAR-Ms, which have the ability to direct the antitumor activity of macrophages towards tumor antigens. The objective of this review is to understand the fundamentals of this therapy and to what extent it can be used as a future cancer treatment.

Keywords: FFUC, MICF, Immunotherapy, CAR, Solid tumors, Functional plasticity, Macrophages, CAR-M.

Índice Geral

PARTE I - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	9
1. Introdução	10
2. Análise SWOT	10
3. Farmácia Ygeia	10
3.1. Pontos Fortes	11
3.1.1. Exigência e acompanhamento do diretor técnico	11
3.1.2. Atendimento ao Balcão.....	11
3.1.3. Integração e Espírito de equipa.....	11
3.1.4. Frequência do Estágio	12
3.1.5. Estagiário Único	12
3.1.6. Diversidade de Tarefas Realizadas	12
3.1.7. Sifarma 2000®	13
3.2. Pontos Fracos	13
3.2.1. Insegurança no Aconselhamento de Produtos de Venda Livre.....	13
3.2.2. Nomes comerciais de medicamentos	13
3.2.3. Comunicação com o utente	14
3.3. Oportunidades	14
3.3.1. Aprendizagem autónoma e aplicação dos conceitos teóricos aprendidos	14
3.3.2. Formação contínua	15
3.3.3. Serviços prestados pela farmácia	15
3.4. Ameaças	15
3.4.1. Falta de Confiança no Estagiário	15
3.4.2. Segundo confinamento devido ao COVID-19.....	16
4. Casos Práticos	16
5. Considerações Finais	20
6. Bibliografia	21
7. Anexo	22

PARTE II - Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Lista de Abreviaturas	24
1. Introdução	25
2. GTM.....	25
2.1. DMK	26
2.2. Pontos Fortes	26
2.2.1. Acolhimento e Integração	26
2.2.2. Condições de Trabalho.....	26
2.2.3. Autonomia de Trabalho.....	27
2.2.4. Diversidade e relevância de tarefas	27
2.2.5. Infraestruturas.....	28
2.2.6. Conhecimentos de Inglês e <i>Microsoft Excel</i> ®	28
2.2.7. Facilidade de apreensão de conhecimentos	28
2.3. Oportunidades	28
2.3.1. Voto de Confiança	28
2.3.2. Participação em Congresso e em Formações	29
2.4. Pontos Fracos	29
2.4.1. Escassa adequação do Mestrado Integrado à realidade de Indústria Farmacêutica	29
2.4.2. Falta de conhecimentos Informáticos.....	30
2.4.3. Pouco contacto com outros Departamentos e no próprio Departamento	30
2.5. Ameaças	30
2.5.1. Concorrência de Profissionais de outras áreas.....	30
3. Considerações Finais	31
4. Bibliografia	32

5. Anexo	32
PARTE III - Monografia "Imunoterapia do cancro: os macrófagos e os CAR-Ms"	
Lista de Abreviaturas.....	33
Resumo.....	35
Abstract.....	36
1. Introdução	38
2. Macrófagos	38
2.1. Ensaios e características ímpares dos macrófagos.....	40
2.2. Métodos de produção de macrófagos.....	40
2.3. Macrófagos no Microambiente Tumoral.....	41
2.4. TAMs, alvos no cancro: Redução e Reprogramação	42
3. CARs.....	44
3.1. Células CAR-T	45
3.2. Células CAR-NK	48
3.3. Células CAR-NKT.....	49
3.4. Células CAR- $\gamma\delta$ T.....	50
4. CAR-Ms.....	50
4.1. Design de CAR-Ms.....	51
4.2. Diferentes tipos de CAR-Ms	53
4.3. Produção e uso de CAR-Ms	55
4.3.1. Plasmídeos/vetores utilizados para introdução de CARs nos macrófagos.....	56
4.3.2. Transdução e infeção viral dos CAR nos macrófagos.....	57
4.3.3. Infusão e diferenciação dos macrófagos após infeção	57
4.3.4. Eficiência e eficácia da transdução de CAR-Ms/avaliação da persistência, biodistribuição e tráfego de CAR-Ms	58
4.4. Caracterização da atividade dos CAR-Ms	59
4.4.1. Avaliação da capacidade de apresentação cruzada de antígenos dos CAR-Ms.....	59
4.4.2. Avaliação da atividade fagocítica dos CAR-Ms.....	60
4.4.3. Avaliação da atividade antitumoral dos CAR-Ms.....	63
4.4.4. Efeito dos CAR-Ms no TME	65
4.4.5. Efeito dos CAR-Ms nos TAMs.....	66
4.4.6. Validação da plasticidade fenotípica dos CAR-Ms	67
4.4.7. Citotoxicidade tumoral e não tumoral	67
4.5. CAR-Ms e o sistema imune adaptativo, combinações racionais com IIC.....	68
4.6. Ensaios clínicos com CAR-Ms	68
4.7. Aplicações Terapêuticas dos CAR-Ms	69
4.7.1. Terapia em tumores mamários com CAR-Ms	69
4.7.2. Terapia noutros tumores com CAR-Ms.....	70
4.8. Vantagens e Desvantagens dos CAR-Ms.....	71
5. Conclusão.....	72
6. Bibliografia	74
7. Anexo	84

PARTE I

Relatórios de Estágio em Farmácia Comunitária



Farmácia Ygeia
Sob orientação do Dr. Jorge Venâncio Branco

Lista de Abreviaturas

DCI - Designação Comum Internacional

MICF ! Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

1. Introdução

O estágio curricular é uma unidade integrante do plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) lecionado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC).

A unidade curricular é obrigatoriamente constituída pela realização de um estágio em farmácia comunitária, que a meu ver assume enorme relevância, apesar de nem todos os farmacêuticos ambicionarem este futuro profissional. Porém, sendo o farmacêutico o mestre do medicamento, faz todo o sentido viver a experiência da mais nobre vertente da profissão.

O presente relatório incide sobre o estágio curricular em farmácia comunitária que realizei entre janeiro e abril de 2021 na Farmácia Ygeia, sob a orientação do Dr. Jorge Venâncio Branco, e tem por base uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), assim como a apresentação de casos clínicos observados na prática da frequência de estágio e a sua respetiva análise crítica.

2. Análise SWOT

A análise SWOT é uma ferramenta muito utilizada por organizações, mas que pode também ser empregue noutras categorias, uma vez que permite fazer avaliações simples e detalhadas que facilitam o desenho de um plano estratégico. Este tipo de avaliação divide-se em duas categorias, externa e interna. Internamente avaliam-se as *Strengths* (Pontos Fortes) e *Weaknesses* (Pontos Fracos), ou seja, as características do nosso estágio que o tornaram mais vantajoso ou desvantajoso relativamente a outros, características estas relativas ao nosso estágio em si, bem como à adequação do Mestrado às perspetivas profissionais. Externamente analisam-se as *Opportunities* (Oportunidades) e *Threats* (Ameaças), isto é, os fatores externos que podem ser empregues no sentido de tornar o estágio mais frutífero e aqueles que são obstáculos à ocorrência de um bom estágio (CORPORATE FINANCE INSTITUTE, 2021).

Posto isto, os presentes relatórios baseiam-se numa análise SWOT, em que o alvo de avaliação é o estágio realizado.

3. Farmácia Ygeia

A Farmácia Ygeia localiza-se na Avenida Dr. João Esteves Simões, em Soure, e é propriedade do Dr. Jorge Venâncio Branco que ocupa o cargo de diretor técnico. A equipa da farmácia é constituída pelo diretor técnico (Dr. Jorge Venâncio Branco), pela farmacêutica Dra. Andreia Brás, pelas técnicas de farmácia Adélia Mendes, Anabela Claro e Paula Branca,

por uma técnica auxiliar de farmácia, Inês Simões, por uma funcionária encarregue da limpeza, e pela responsável por tratar de assuntos financeiros Fernanda Gonçalves.

3.1. Pontos Fortes

3.1.1. Exigência e acompanhamento do diretor técnico

A exigência e acompanhamento prestados pelo do Dr. Jorge são a meu ver os pontos mais fortes do meu estágio curricular. Na primeira semana, explicou-me a forma correta de realizar a maioria das tarefas que me diriam respeito naqueles 4 meses. Nas semanas seguintes supervisionou de perto a realização dessas mesmas tarefas, chamando-me à atenção sempre que errava. Isto aconteceu tantas vezes quantas foram precisas até eu conseguir desempenhar corretamente e de forma autónoma todas as tarefas que me designava. Ao longo do tempo estava na maioria das vezes disponível para me ensinar novos conceitos e tarefas, tendo sido “Precisas de ajuda?”, a frase que mais escutei em todo o estágio.

Decidi destacar este ponto, porque tenho perfeita noção que na maioria das farmácias isto não acontece, já que os diretores técnicos estão muitas vezes sobrecarregados com trabalho, acabando por não ter tempo para os estagiários. Porém, o Dr. Jorge teve tempo para gerir, exercer as suas funções e acompanhar-me de forma acérrima. Com ele cresci enquanto pessoa, e sobretudo enquanto profissional. Incutiu em mim o “primar pela qualidade”, o “fazer muito, mas sempre BEM”!

3.1.2. Atendimento ao Balcão

Sem dúvida o segundo ponto forte do meu estágio. Desde a primeira semana que observei a realização de atendimentos pelos vários membros da equipa e realizei atendimentos com a supervisão do diretor técnico. Na terceira semana já me sentia minimamente à vontade para a realização desta tarefa de forma autónoma, surgindo, ainda assim, algumas dúvidas em situações distintas das típicas do dia-a-dia de farmácia comunitária.

3.1.3. Integração e Espírito de equipa

No primeiro dia de estágio fui apresentada pelo diretor técnico a todos os membros da equipa, ponto-chave para uma boa integração. Para além disso, a simpatia dos vários membros, a sua total disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas ou troca de impressões, assim como a boa relação entre todos também foram uma mais-valia para a minha adaptação. Apesar de ter realizado outros estágios anteriormente, nunca antes tinha estado num local em que todos os membros da equipa se relacionassem totalmente bem. Na

Farmácia Ygeia isso existe, todos são amigos de todos, todos se entreeajdam. Este espírito é de tal forma forte que 4 dos 6 membros da equipa trabalham juntos há mais de vinte anos.

3.1.4. Frequência do Estágio

Inicialmente, dialoguei com o diretor técnico para definir o horário de estágio, o qual deixou ao meu critério a escolha do mesmo, excluindo à partida os horários de fim de semana e noturno, situação que considerei bastante benéfica, pois possuiria mais tempo livre para a escrita da monografia. Por outro lado, esta liberdade de escolha permitiu-me agilizar o meu tempo com as necessidades da farmácia, já que em dias de mais trabalho tinha a liberdade de permanecer mais horas na farmácia, situação que me permitiu ter a noção dos diferentes fluxos de utentes ao longo do dia e das diversas tarefas realizadas, inclusive do momento de fecho. No fundo fez-me sentir realizada, já que podia contribuir nos momentos de mais trabalho.

3.1.5. Estagiário Único

O facto de ser a única estagiária, é a meu ver um ponto muito positivo, que se fundamenta em dois motivos. Por um lado, um maior acompanhamento por parte de toda a equipa, o que me permitiu uma maior e mais rápida aquisição de competências e autonomia. Por outro lado, uma maior compreensão por parte dos utentes, uma vez que, a meu ver os mesmos aceitam mais facilmente que um atendimento demore mais tempo que o habitual, quando realizado por uma pessoa que está a aprender, do que vários atendimentos demorados, por existirem simultaneamente várias pessoas a aprender.

3.1.6. Diversidade de Tarefas Realizadas

Durante o estágio tive a oportunidade de desempenhar diversas tarefas, estas consistiram em: receção de encomendas, atendimento ao balcão, dinamização e gestão do espaço físico da farmácia, armazenamento e gestão de existências, elaboração de folhas de gastos mensais para lares e utentes (especialmente importante no sentido em que trabalhei com o *Microsoft Excel*[®], ponto fundamental para iniciar o meu estágio seguinte com alguma destreza, uma vez que muitos dos trabalhos realizados envolviam esta aplicação informática).

Este é a meu ver um ponto muito forte, pois permitiu-me ter a noção da panóplia de tarefas desempenhadas por um Farmacêutico Comunitário, que não se restringem ao atendimento ao balcão, assim como, adquirir competências que me tornam capaz de as desempenhar no futuro.

3.1.7. Sifarma 2000®

A Farmácia Ygeia dispõe do *software* Sifarma 2000®. No decurso de alguns atendimentos ao balcão recorri a este sistema para complementar o meu aconselhamento, por exemplo com indicações de posologia, contraindicações ou outras questões úteis para o utente. Para além disso, a sua consulta possibilitou-me conhecer a medicação habitual dos utentes, evitando que estivesse constantemente a questioná-los sobre qual o laboratório de preferência, o que é fundamental para uma boa relação Farmacêutico - Utente, até porque cria margem para a realização de questões fulcrais, para o conhecimento do bem-estar do utente, assim como para estreitar esta relação. Esta ferramenta facilitou também o meu processo de adaptação, já que a ficha de cada produto possui informação da sua localização, composição, indicação terapêutica, interações, etc., permitindo-me conhecer os locais de armazenamento dos diferentes produtos de forma mais célere, assim como os produtos no seu todo, o que foi especialmente importante relativamente àqueles que não conhecia previamente ao início do estágio.

3.2. Pontos Fracos

3.2.1. Insegurança no Aconselhamento de Produtos de Venda Livre

Na Farmácia Ygeia existe uma enorme variedade de produtos de venda livre, tendo sentido alguma insegurança no aconselhamento dos mesmos. Apesar do MICF nos preparar para o aconselhamento farmacológico, alguns produtos vendidos nas farmácias comunitárias não são abordados em momento algum durante a formação académica. Muitos destes eram para mim desconhecidos antes do estágio e sem conhecimento é impossível aconselhar bem. Um bom aconselhamento farmacêutico é uma ferramenta fulcral para distinguir as farmácias comunitárias de outros locais de venda de produtos farmacêuticos. Considero por isso, que seria relevante adaptar o plano de estudos de MICF no sentido de integrar mais unidades curriculares ou completar os programas de forma a integrar informação adicional relativa a produtos de venda livre.

3.2.2. Nomes comerciais de medicamentos

O ensino no MICF é direcionado para a designação comum internacional (DCI), sem menção dos nomes comerciais, o que me conferiu algumas dificuldades iniciais, pois por vezes, os utentes solicitavam fármacos pelo nome comercial e ficava sem saber a que DCI correspondiam, ou os utentes apresentavam receitas médicas prescritas por DCI e solicitavam especificamente os medicamentos de marca, então ao consultar a ficha do utente

tinha dificuldade em perceber que marca correspondia a que DCI. Estas dificuldades desvaneceram-se ao longo do tempo de estágio.

3.2.3. Comunicação com o utente

No dia-a-dia da Farmácia Ygeia era normal atender pessoas de vários extratos sociais, com diferente formação escolar, de faixas etárias distintas. Anteriormente ao início do estágio achava que seria mais difícil comunicar com pessoas mais velhas. Ao fim da primeira semana constatei que não era o caso e que não podia criar estereótipos. Atendi idosos extremamente sábios e jovens com carência de conhecimento, percebi que teria de adaptar o meu discurso a cada pessoa individualmente. Sou caracteristicamente uma pessoa direta que habitualmente não faz rodeios à volta de uma questão. Trabalhei esta característica, mas mesmo assim a comunicação não ficou tão facilitada quanto ambicionava, especialmente quando não dispensava aos utentes os fármacos que pretendiam. Mesmo depois de explicar detalhadamente o porquê de não poder fazer a dispensa, via na expressão dos utentes insatisfação. Houve uma situação em que o próprio Dr. Jorge interveio, e reforçou as minhas palavras, no entanto a insatisfação manteve-se, isto porque comunicar com pessoas será sempre uma das tarefas mais árduas, independentemente da nossa faixa etária ou da nossa formação.

3.3. Oportunidades

3.3.1. Aprendizagem autónoma e aplicação dos conceitos teóricos aprendidos

Na minha falta de conhecimento sobre alguns dos produtos vendidos na farmácia vi uma oportunidade para aprender, quando havia tempo livre, o que era raro, dedicava-me a circular pela farmácia, observar os produtos, ler os rótulos e os folhetos informativos, quando existiam. Outra parte da aprendizagem foi feita a consultar o *site* das Farmácias Portuguesas ou os *sites* oficiais das marcas, assim como, as páginas das redes sociais, onde assisti a vários *Lives*, para mim de enorme relevância, porque as formadoras estavam em direto a transmitir informação e por fim disponibilizavam-se para responder a questões da audiência. Porém, uma parte muito importante da aquisição de conhecimentos concentrou-se na escuta e observação dos aconselhamentos da equipa.

Por outro lado, senti também que algumas unidades curriculares, nomeadamente “Indicação Farmacêutica”, “Preparações de Uso Veterinário”, “Dermofarmácia e Cosmética”, foram de enorme relevância para melhorar o aconselhamento farmacêutico, por mim prestado, já que me conferiram uma base de conhecimento teórico que me permitiu ao longo do tempo apreender de forma facilitada conceitos nestas áreas.

3.3.2. Formação contínua

Durante o estágio pude participar em oito formações, algumas presenciais e outras online devido ao COVID-19, sendo que três delas foram fora do horário laboral. Os temas abordados foram “Suplementação de Vitamina D e Selênio; contexto COVID-19”, “Produtos dietéticos: Dieta *Easy Slim*®”, “Saúde Íntima Feminina”, “Nutrição na doença oncológica”, “Oligossacáridos do Leite Materno”, “Síndrome do Intestino Irritável”, “Diosmina Micronizada: da Farmacopeia Europeia ao aconselhamento”, “Curaprox®”. Um porta-voz ou uma equipa do laboratório deslocava-se à farmácia ou realizava uma reunião *online*, para transmitir informação relevante sobre um dado tema ou produto. Adicionalmente, tive também oportunidade de assistir a formação promovida internamente, ou seja, um dos farmacêuticos transmitia à restante equipa a informação científica mais relevante, relativa a um produto. Este ponto é para mim de enorme relevância, porque cada vez que surgiam produtos novos o diretor técnico esforçava-se para que todos os membros da equipa recebessem informação técnica relativa aos mesmos, ponto fulcral, para despertar o desejo de aquisição de mais conhecimento e para que o nosso atendimento se distinguisse.

3.3.3. Serviços prestados pela farmácia

A Farmácia Ygeia presta vários tipos de serviços: determinação da glicémia, colesterol e tensão arterial; consultas de nutrição e podologia. A prestação destes serviços demonstrou-se de enorme relevância em contexto pandémico, já que a frequência das consultas médicas era inferior à recomendada. Assim sendo, enquanto estagiária tive a oportunidade de realizar várias medições de glicemia, colesterol e tensão arterial, o que me permitiu pôr em prática técnicas aprendidas nalgumas unidades curriculares. Por outro lado, durante a realização das medições estava sozinha num gabinete com os utentes, o que me conferia oportunidade para conversar, estabelecendo uma relação de maior proximidade com os utentes e simultaneamente esclarecer algumas questões que eram sua preocupação. No que toca às consultas de nutrição e podologia, considero-as também uma mais-valia, já que terminadas as consultas os utentes dirigiam-se ao balcão da farmácia para a aquisição de produtos recomendados pelos profissionais, facilitando a obtenção de conhecimento sobre estas áreas.

3.4. Ameaças

3.4.1. Falta de Confiança no Estagiário

Apesar de sentir confiança por parte da equipa, durante a realização de atendimentos senti falta de confiança por parte de alguns utentes. Não sei se por ser jovem, se por ter um

cartão a dizer “Estagiário”. Compreendo esta situação, porque efetivamente eu própria senti alguma falta de conhecimento inicial, nalgumas áreas para as quais o MICF está menos direcionado. Porém, entristece-me observar que os utentes desvalorizam uma formação de cinco anos, que de facto nos confere um vasto conhecimento, apenas porque somos jovens ou ainda temos pouca experiência.

3.4.2. Segundo confinamento devido ao COVID-19

A realização do meu estágio coincidiu em parte com o segundo “Confinamento Geral”. Esta situação diminuiu a afluência de utentes à farmácia, reduzindo a quantidade de trabalho e refletindo-se no orçamento das farmácias. Aproveitava os dias pacatos para ler ou conhecer melhor os produtos existentes, porém considero mais benéfica a aquisição de conhecimento a partir da experiência, ou seja, através do atendimento a utentes, ou realização de outras tarefas, que ficaram diminuídas durante este período. Por outro lado, os utentes evitavam dirigir-se aos Centros de Saúde, recorrendo à farmácia em situações graves, para as quais esta não está preparada. Presenciei situações de hemorragias que não estancavam, infeções oculares, ou infeções vaginais, porque as pessoas tinham “medo” de se deslocar aos Centros de Saúde, fazendo-o só após indicação para tal. Outro cenário era a tentativa de aquisição de medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) sem receita, quer porque tinham perdido a consulta de acompanhamento, quer porque estavam com uma infeção que já tinham tido anteriormente e não se queriam deslocar ao Centro de Saúde para o médico voltar a prescrever o antibiótico, ficando os utentes revoltados, por negarmos a dispensa de um medicamento de que necessitavam.

4. Casos Práticos

Caso I

Senhora de cerca de 70 anos dirige-se ao balcão da farmácia e solicita um xarope para a tosse, questionei se se tratava de uma tosse seca ou com expetoração, respondendo-me com expetoração. Seguidamente questionei se tinha asma e a resposta foi negativa. Aconselhei a toma de Flumucil® (Acetilcisteína) (INFARMED, 2021). A senhora pediu também se seria possível medir a tensão ao marido, pois nos últimos dias andava muito ofegante, solicitando em simultâneo umas pastilhas para a garganta. Perguntei se sentia dor ao engolir ou irritação, pelo que me respondeu dor. Neste caso seria mais indicado umas pastilhas que contivessem anti-inflamatório, no entanto, dada a respiração ofegante que o senhor apresentava e as propriedades broncoconstritoras dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), achei melhor recomendar umas pastilhas apenas com antiséptico,

Strepils[®], uma vez que o senhor era diabético sugeri os Strepils[®] de Limão sem açúcar (INFARMED, 2018), que recomendei tomar com um intervalo de 2 a 3 horas, em caso de necessidade. Posteriormente procedi à determinação da tensão arterial durante a qual me apercebi que o senhor apresentava extrema dificuldade em respirar, tendo por isso questionado se tinham tido contacto com casos positivos de COVID-19, questão à qual a senhora me respondeu negativamente, afirmando que dada a situação o marido já tinha feito o teste, cujo resultado foi negativo. Os valores de tensão arterial foram obtidos num tensiómetro que faz a média de 3 medições, permitindo assim obter resultados mais precisos. Estes valores foram de 160/102 mmHg, para a pressão sanguínea sistólica e diastólica, respetivamente, classificando-se segundo as normas, como hipertensão arterial (DGS, 2013). Em suma, dado o estado fisiopatológico geral do utente cumulativamente com o facto de já estar medicado para a hipertensão, aconselhei que caso não apresentasse melhoras, deveria consultar o médico de família.

Caso 2

Senhora de 40 anos, acompanhada da filha de 14, dirige-se à farmácia. Por iniciativa própria escolhem um gel de banho e seguidamente solicitam ajuda para uma crise de acne pela qual a menina está a passar. Inicialmente referi a extrema importância de fazer limpeza diária da pele de manhã e à noite, procedimento que me disseram já fazer parte da rotina. Seguidamente recomendei um *pack* oferta de uma gama de cosmética direcionada para o tratamento do acne, que continha um sérum de dia e um de noite assim como um gel creme também para usar de manhã e à noite. Esta pareceu-me a melhor opção já que com a compra de apenas um produto a utente poderia usufruir de quatro na realidade, no entanto sugeri também a aquisição dos mesmos produtos de forma separada ou de apenas um, caso o *pack* não fosse monetariamente suportável. A decisão final foi o *pack*, incentivado pela minha referência ao facto de que com quatro produtos havia uma maior probabilidade de eficácia do tratamento do que com apenas um. Para além da venda recomendei que adquirisse uma rotina diária de limpeza, no momento de chegada a casa em vez de o fazer apenas ao final do dia, já que a máscara contribui para a proliferação de inúmeros microrganismos prejudiciais para a saúde da pele. Mãe e filha demonstraram-se agradadas pela aquisição, porém havia outro motivo pelo qual se dirigiam à farmácia. O marido tinha começado a sentir comichão na zona íntima, sugeri vários produtos de higiene íntima, tendo a decisão de compra recaído sobre um já anteriormente utilizado. Questionei se a comichão era acompanhada de outros sinais, como vermelhidão e a localização exata, se virilhas ou órgãos genitais. Questões às quais não me sabia responder, pois ainda não tinha estado

presencialmente com o marido. Assim sendo, sugeri que utilizasse o produto de higiene íntima, mas que caso a comichão não passasse poderia dirigir-se novamente à farmácia, com informação mais detalhada do problema e se necessário, aquisição de uma pomada com óxido de zinco e miconazol, que provavelmente ajudaria a resolução do mesmo, já que o miconazol ajuda a controlar a proliferação de microorganismos na pele e o óxido de zinco possui ação regeneradora, protetora e calmante dos tecidos (MEDINFAR, 2020).

Caso 3

Senhora de 65 anos, hipertensa medicada, dirige-se à farmácia para levantar a medicação habitual. Para além dos medicamentos prescritos, solicita Vigantol[®] e Magnoral[®], transmitindo a informação de que sofre de câibras e que habitualmente toma Magnoral[®]. Tendo em conta esta informação e que não tem problemas renais, dispenso o fármaco (INFARMED, 2015). Questiono o motivo pelo qual pretende adquirir Vigantol[®] e se fez alguma determinação da Vitamina D, dizendo-me que não, mas que uma amiga toma e havia recomendado. Alerto para o facto de o Vigantol[®] ser um medicamento sujeito a receita médica, que apenas deve ser tomado por recomendação médica. Sugerindo que, se acha que tem necessidade de tomar Vitamina D, pode optar pela toma de um suplemento, enquanto não consulta o médico (PRONTUÁRIO TERAPÊUTICO, 2016). Seguidamente queixa-se que tem sentido palpitações, pergunto se já tinha informado o médico de medicina geral e familiar, refutando que já não ia a uma consulta há mais de um ano. Questiono se tem medido a tensão arterial e obtenho uma resposta negativa. Sugiro proceder a uma determinação da pressão arterial. Os valores obtidos são de 130/ 75 mmHg, não sendo justificação para as palpitações sentidas. Diz também que sofre de muitas dores nas articulações, inquirio se alguma vez fez uma determinação do ácido úrico, replicando negativamente. Dadas as palpitações, a restante história clínica e o largo intervalo de tempo desde a última ida ao médico, sugiro a marcação de uma consulta na qual deve transmitir ao médico todos os sinais e sintomas que se têm manifestado, para que este possa ajustar a medicação e retirar conclusões em relação à sua situação clínica.

Caso 4

Senhora com cerca de 40 anos dirige-se à farmácia para comprar a medicação habitual, mas no momento final do atendimento refere que sente um ardor e irritação vaginal, e solicita um creme para atenuar estes sintomas. Questiono acerca da localização das queixas, obtenho informação de que se limitam à zona interna. Sugeri então a utilização de uma cápsula mole vaginal, em vez do creme, já que esta é de apenas uma utilização e

permanece no local de ação, enquanto o creme tende a descer durante a noite, o que permite um efeito mais rápido e mais eficaz (INFARMED, 2016). Posteriormente questionei se utilizava algum produto específico de higiene íntima ao qual me disse que não. Posto isto, uma vez que não existia comichão externa, sugeri a utilização de um gel de lavagem íntima com pH ácido, que ajuda a manutenção do pH vaginal fisiológico, fundamental para a preservação da saúde da flora vaginal (BAYER, [s.d.]).

Caso 5

Rapaz de 30 anos desloca-se à farmácia, com indicação médica para solicitar ajuda do farmacêutico na escolha dos produtos mais adequados ao seu problema de pele. Apresentava inúmeras manchas escuras no rosto, melasma. Primeiramente alertei para a importância da utilização de proteção solar, questionando-o se tinha este tipo de cuidado. Retorquiu que não utilizava qualquer cuidado cosmético, mas tinha intenção de o fazer. Posto isto, tratando-se de um indivíduo do sexo masculino, que pretendia iniciar uma rotina de cuidados não muito complexa, comecei por aconselhar um cuidado despigmentante de dia com fator de proteção solar (SPF). Tendo em conta, a intensa hiperpigmentação em algumas zonas da face adverti que seria mais prudente complementar o tratamento com um cuidado despigmentante de noite. Finalmente, inquiri se possuía alguma rotina de limpeza. Respondeu-me negativamente. Seguidamente fiz algumas questões adicionais sobre as características da sua pele, tendo concluído que se tratava de uma pele sensível. Deste modo apresentei vários produtos de limpeza, como: água micelar e gel mousse, adequados para peles sensíveis, tendo a escolha recaído sobre a água micelar, uma vez que foi a opção considerada mais prática. Por fim, ofereci uma amostra de uma ampola da mesma linha de cuidados despigmentantes dos cremes vendidos, alertando para o facto de que devia ser colocada antes do creme e que a sua utilização ajudaria a aumentar a observação de resultados.

5. Considerações Finais

O estágio curricular é a meu ver uma mais-valia. Durante cinco anos são nos fornecidas ferramentas para no exercício profissional sermos capazes de selecionar e interpretar facilmente e de forma correta a panóplia de informação que temos ao dispor. Assim o estágio em farmácia comunitária tratou-se de um período de incerteza inicial que se seguiu de uma crescente aquisição de conhecimentos. Posso dizer que foi o auge do meu percurso letivo, porque senti que mesmo não sabendo tudo, tinha conhecimento suficiente para analisar acerrimamente as situações observadas.

Considero que num período de quatro meses aprendi imenso em termos científicos e de aconselhamento farmacêutico e apreendi conceitos que levo para a vida e para o futuro profissional. Uma questão basilar foi o “questionar antes de errar”. Várias vezes no estágio de indústria farmacêutica surgiram dúvidas e todas essas vezes me lembrei da máxima anteriormente assimilada.

Este estágio fez-me perceber o verdadeiro significado de ser farmacêutico. E ser farmacêutico, é ter conhecimento de base e a partir daí, aprender todos os dias, aprender e pôr esse conhecimento em prática, sem nunca deixar de ter espírito crítico.

6. Bibliografia

1. BAYER - **Gino-Canesfresh Daily**. [Acedido a 20 de maio 2021] Disponível na Internet: <https://www.antifungicos.bayer.pt/produtos/saude-intima-feminina/gino-canesfresh-daily>
2. CORPORATE FINANCE INSTITUTE - **SWOT Analysis**. [Acedido a 5 de julho 2021] Disponível na Internet: <https://corporatefinanceinstitute.com/resources/knowledge/strategy/swot-analysis/>
3. DGS - Hipertensão Arterial: definição e classificação. **Norma da Direção Geral da Saúde (020/2011)**. [Acedido a 20 de julho 2021] Disponível na Internet: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n0202011-de-28092011-atualizada-a-19032013-jpg.aspx>
4. INFARMED - **Resumo das Características do medicamento Magnoral® 1028,4mg/10ml**. [Acedido a 30 de julho 2021] Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
5. INFARMED - **Resumo das Características do medicamento Gino-Canesten® 10mg, Cápsula mole vaginal**. [Acedido a 25 de julho 2021] Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
6. INFARMED - **Resumo das Características do medicamento Strepsils® Limão sem Açúcar 1,2mg + 0,6mg Pastilhas**. [Acedido a 26 de julho 2021] Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
7. INFARMED - **Resumo das Características do medicamento Fluimucil® 4%, 40mg/ml solução oral**. [Acedido a 26 de julho 2021] Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
8. MEDINFAR - **Halibut®**. [Acedido a 20 de maio 2021] Disponível na Internet: <https://halibut.pt/produtos/halibut-muda-fraldas#>
9. **Prontuário Terapêutico**. [Acedido a 20 de abril 2021] Disponível na Internet: <http://app10.infarmed.pt/prontuario/framepesactivos.php?palavra=vigantol&x=0&y=0&rb1=0>

7. Anexo

Tabela I: Tabela Resumo da Análise SWOT

	Fatores Positivos	Fatores Negativos
Fatores Internos	<p>Strengths (Pontos Fortes)</p> <ul style="list-style-type: none">Exigência e acompanhamento do diretor técnicoAtendimento ao balcãoIntegração e espírito de equipaFrequência do estágioEstagiário únicoDiversidade de tarefas realizadasSifarma 2000®	<p>Weaknesses (Pontos Fracos)</p> <ul style="list-style-type: none">Insegurança no aconselhamento de produtos de venda livreNomes comerciais de medicamentosComunicação com o utente
Fatores Externos	<p>Opportunities (Oportunidades)</p> <ul style="list-style-type: none">Aprendizagem autónoma e aplicação dos conceitos teóricos aprendidosFormação contínuaServiços prestados pela farmácia	<p>Threats (Ameaças)</p> <ul style="list-style-type: none">Falta de confiança no estagiárioSegundo confinamento devido ao COVID-19

PARTE II

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica



Grupo Tecnimede
Sob orientação do Dr. João Tibério Peniche

Lista de Abreviaturas

DIM ! Delegado de Informação Médica

DMK - Departamento de *Marketing*

GTM - Grupo Tecnimede

I. Introdução

O presente relatório tem como objetivo descrever o estágio curricular que realizei em indústria farmacêutica, mais concretamente no Departamento de *Marketing* (DMK) do Grupo Tecnimede (GTM), que decorreu de 7 de maio a 31 de julho, sob orientação do Dr. João Tibério e tutoria da Dra. Filipa Matos Ferreira.

Ao longo do meu percurso letivo realizei vários estágios, com o objetivo de conhecer a realidade laboral de um farmacêutico, e desta forma ter uma ideia clara do futuro profissional que ambiciono, no momento de término do mestrado. Quando iniciei o 5.º ano de MICEF, ainda não tinha tido qualquer experiência no contexto de indústria farmacêutica e sendo esta para mim uma área de interesse decidi que parte do meu estágio curricular seria realizado neste contexto.

A escolha pelo GTM, foi previamente planeada. Fiquei a par da existência da empresa por volta do meu 3.º ano de faculdade, quando tomei conhecimento que alguns colegas realizariam o seu estágio nesta organização. Posteriormente, voltei a ouvir falar sobre o GTM quando o Professor António Donato foi meu docente, pessoa que admirei desde o início, pela inteligência que transmite nas palavras, por isso, e porque sou extremamente curiosa comecei a pesquisar sobre o GTM. Inicialmente percebi que este grupo seria uma das maiores indústrias farmacêuticas portuguesas, o que me levou a ambicionar realizar o meu estágio no seu seio, posteriormente, li que o GTM havia sido considerado pela Exame, Informa D&B e Deloitte, a “Melhor Empresa no âmbito das 500 Maiores & Melhores Empresas Portuguesas”. Sendo este prémio de enorme mérito, até porque a Deloitte é uma das consultoras mundiais mais influentes, o que contribuiu para que ficasse 100% certa da minha decisão, pois ao longo da minha vida sempre ambicionei estar entre os melhores!!

2. GTM

O GTM surgiu em 1980, tendo à data a designação de Tecnimede, ao longo do tempo foi diversificando a sua atividade, constituindo empresas farmacêuticas como Pentafarma, Farmoz e Tecnigen e unidades industriais como West Pharma e Atlantic Pharma, assim como, expandido a sua presença para o estrangeiro (Colômbia, Espanha, Itália, Marrocos, Brasil), possuindo atualmente o nome de Grupo Tecnimede (TECNIMEDE, [s.d.]).

O GTM é uma empresa 100% portuguesa, representada em várias áreas de negócio: *Consumer Health*, Inovadores, Genéricos e Hospitalar. Tem como principais focos a investigação e desenvolvimento (I&D) e a internacionalização (TECNIMEDE, [s.d.]).

2.1. DMK

Um DMK é responsável por gerar a força de vendas de uma organização. O DMK do GTM subdivide-se em quatro grandes áreas: *Consumer Health* (Tecnimed), Inovadores (Tecnimed), Genéricos (Tecnigen) e Hospitalar (Farmoz) (TECNIMEDE, [s.d.]). Durante o meu estágio tive a oportunidade de integrar a secção de Inovadores, que tem a seu cargo a promoção e divulgação de fármacos inovadores desenvolvidos ou promovidos pelo GTM. Esta secção é dirigida pelo Dr. João Tibério, que é simultaneamente o responsável do DMK. Adicionalmente o departamento é constituído por cinco *product managers* (PMs), 60 delegados de informação médica (DIMs) e 5 chefes regionais de vendas (CRVs).

2.2. Pontos Fortes

2.2.1. Acolhimento e Integração

O processo de acolhimento ficou a cargo do departamento de Recursos Humanos. Consistiu num dia exclusivo para esta finalidade. No período da manhã foram feitas apresentações por parte dos responsáveis dos vários gabinetes do DMK e pela responsável dos Recursos Humanos. Seguidamente, o almoço foi oferecido pela empresa. No período da tarde, procedemos a um reconhecimento das instalações do GTM, que envolveu a visita à Unidade de Produção e ao DMK, nomeadamente ao local onde passaria a trabalhar. Durante esse reconhecimento, foi possível ficar a conhecer alguns dos membros da equipa. O dia terminou com uma pequena conversa com o orientador de estágio, que me colocou a par dos horários e regime de estágio, assim como da pessoa que ficaria responsável pela minha tutoria, a Dra. Filipa Matos Ferreira, PM da área cardiometabólica. No que diz respeito à integração, dada a dimensão do GTM e o número significativo de colaboradores, considerei que a presença de antigos estudantes da FFUC na empresa facilitou este processo, isto porque a permanência em espaços partilhados era limitada, devido à pandemia, por conhecer previamente estas pessoas, o diálogo com as mesmas facilitou o estabelecimento de contactos com outros colaboradores.

2.2.2. Condições de Trabalho

No contexto pandémico, o DMK do GTM adotou uma estratégia laboral bipartida, na qual os trabalhadores desenvolvem, em semanas alternadas, trabalho remoto e presencial. Situação favorável, pois permitiu a manutenção de um ambiente de trabalho seguro, já que esta forma de distribuição dos funcionários pelos espaços proporciona a utilização de um gabinete apenas por um ou dois colaboradores e por outro lado permitiu a minha presença na empresa, o que possibilitou maior aprendizagem, interação com os restantes

colaboradores e integração na equipa. Simultaneamente, permitiu-me ter uma primeira experiência de teletrabalho, que considero benéfica, pois na minha opinião a rentabilidade laboral aumenta, ficando exacerbada neste regime bipartido, que facilita a obtenção de benefícios de ambos os regimes. Para além disso, na semana em que iniciei o estágio foi-me entregue um computador da empresa, com todos os *softwares* e ferramentas necessários para trabalhar, que ficou à minha responsabilidade, facilitando a realização de trabalho remoto. Recebi também uma remuneração, ponto bastante positivo, já que não é um procedimento habitual em estágios curriculares e dadas as despesas com habitação e deslocação implicadas.

2.2.3. Autonomia de Trabalho

No primeiro dia de estágio a minha tutora apresentou-se, contextualizou o trabalho por ela realizado e após detalhada explicação, destinou-me uma tarefa. Para mim um ponto extremamente positivo, já que, desde o primeiro dia fiquei encarregue de pequenos trabalhos, que desenvolvia de forma autónoma e depois aperfeiçoava consoante orientação da Dra. Filipa. Adicionalmente, durante a primeira semana, um outro membro do departamento pôs-me a par dos *softwares* de trabalho e explicou-me pormenorizadamente como utilizá-los. Assim sendo, adquiri capacidade de os utilizar de forma independente, apesar de ao longo do tempo surgirem pequenas dúvidas que me eram rapidamente esclarecidas.

2.2.4. Diversidade e relevância de tarefas

No decorrer do estágio preenchi formulários de notificação (de publicidade, prévia e de transparência), para posterior envio à Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P (INFARMED); realizei registos de *compliance*; pesquisa e análise de artigos científicos para avaliar a utilidade do seu emprego na geração de materiais promocionais e resumo de artigos científicos em caso de parecer favorável; relatórios mensais de vendas relativos a produtos comercializados pela Tecnimede mas propriedade de outras indústrias; *powerpoints* para apresentação de fármacos pelos DIMs aos médicos, com base na leitura detalhada de artigos científicos; tabelas de comparação de preço no contexto do regime geral (RG) e regime especial (RE) de comparticipação; revisão de materiais promocionais, procedendo às alterações necessárias e realização de tabelas esquemáticas das atividades promocionais realizadas mensalmente. Para além da diversidade de tarefas desenvolvidas, senti que todos os trabalhos realizados eram relevantes, o que foi bastante importante na manutenção da minha motivação.

2.2.5. Infraestruturas

A empresa dispõe de um estacionamento privado e de uma cantina destinada aos funcionários. Esta é a meu ver uma mais-valia, pois, apesar dos colaboradores, assim como os estagiários receberem subsídio de refeição, podem optar por usufruir das refeições da cantina. Para além disto, está também disponível um espaço com vários micro-ondas para quem prefere levar a sua própria refeição, o que facilita imenso a rotina dos colaboradores e promove a sua segurança (em contexto de pandemia).

2.2.6. Conhecimentos de Inglês e *Microsoft Excel*®

A maioria dos artigos utilizados para a construção de materiais promocionais estão escritos em inglês. Para além disso, os *softwares* com que o DMK trabalha (HMR, IMS), também são em inglês, posto isto, considereii benéfico possuir conhecimentos desta língua, que facilitaram, quer a seleção e análise de artigos científicos, quer o trabalho com os *softwares*. Adicionalmente, o facto de ter já uma formação em *Microsoft Excel*® e ter trabalhado com esta aplicação informática previamente no estágio de farmácia comunitária, tornou possível a execução de várias tarefas sem que surgissem dúvidas. Isto porque, o *Microsoft Excel*® é extremamente utilizado no DMK, tanto no contexto de HMR, como para realizar comparações de preço, etc.

2.2.7. Facilidade de apreensão de conhecimentos

Apesar da área do *Marketing* não ser uma especialidade do farmacêutico, considero que qualquer aluno formado no MICEF pela FFUC tem imensa facilidade de integração num DMK de uma indústria farmacêutica. Para além dos conhecimentos científicos apreendidos, faz parte do plano de estudos uma unidade curricular designada “Comunicação e Marketing Farmacêutico”, que nos fornece conhecimento sobre a área do *marketing* e desta forma facilita a inclusão nestes departamentos. Também o conhecimento científico adquirido durante a formação académica é fulcral, pois, para promover um produto é extremamente importante conhecê-lo e percebê-lo. No entanto, considero que para alguém que pretenda evoluir profissionalmente na área é importante a realização de uma pós-graduação, ou qualquer outro tipo de formação, direcionada à área do *marketing* e vendas.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Voto de Confiança

A Dra. Filipa pôs-me completamente à vontade desde o primeiro momento. Assim, ao longo do estágio, fui tendo várias oportunidades para expressar a minha opinião sobre os

trabalhos realizados ou fazer reparos sobre pontos que considerava menos bem e que deviam ser melhoradas. O que me fez sentir, que a minha opinião era valorizada.

2.3.2. Participação em Congresso e em Formações

Durante o estágio fui a uma convenção que ocorreu no contexto do lançamento de um novo fármaco. Decorreu em Peniche, por ser um ponto central do país e foi a meu ver relevante, por me permitir conhecer melhor os membros da equipa, ter o primeiro contacto com alguns DIMs e CRVs, confraternizar num ambiente mais descontraído, facilitando a troca de impressões e o conhecimento das tarefas que executam.

Ao longo do estágio, tive também oportunidade de participar em *webinars* e formações promovidas pela empresa, na maior parte dos casos dirigidas a DIMs, mas nas quais pude participar. Estas formações foram relevantes no sentido em que me permitiram conhecer melhor a realidade de trabalho, outros membros da equipa, assim como, obter conhecimento em áreas específicas relevantes no contexto laboral, como por exemplo, na área jurídica.

2.4. Pontos Fracos

2.4.1. Escassa adequação do Mestrado Integrado à realidade de Indústria Farmacêutica

Durante a realização do meu estágio, senti que teria sido benéfico a prévia aquisição de alguns conhecimentos. Não me refiro a conhecimentos teóricos para aplicação na prática profissional, mas sim a uma unidade curricular que fizesse a contextualização do ambiente industrial, fornecesse conhecimentos das várias áreas de trabalho existentes no seio da indústria farmacêutica, a forma como se dividem e o trabalho realizado no contexto de cada uma. Isto é, uma unidade curricular idêntica à de “Farmácia Hospitalar”, mas direcionada à indústria. Até porque, este conhecimento prévio tem implicações diretas no interesse que os estudantes desenvolvem pela área, que na minha opinião deve ser estimulado, durante a formação académica. Reconheço que a FFUC tem feito um esforço neste sentido, por exemplo, ao promover visitas de estudo a unidades de produção, no entanto, todas estas com número limitado de pessoas. Situação que contribui para que muitos estudantes terminem o MICEF sem qualquer contacto prévio com a realidade industrial. Acho que estas visitas devem continuar a ser promovidas, no entanto, pressuponho de maior importância a implementação de uma unidade curricular, com as características referidas anteriormente.

2.4.2. Falta de conhecimentos Informáticos

Apesar de ter realizado uma formação em *Microsoft Excel*[®] e ser para mim relativamente fácil utilizar esta aplicação informática, ao considerar o tempo integral do estágio, chego à conclusão que a falta de conhecimentos informáticos no seu todo, me conferiu algumas dificuldades. Apesar do DMK do GTM trabalhar com agências publicitárias, por vezes havia necessidade de elaborar materiais, que posteriormente não seriam enviados para estas agências. Situação na qual a minha falta de conhecimento ficava exacerbada, mesmo sabendo utilizar o *Microsoft PowerPoint*[®], nunca trabalhei, nem tenho qualquer formação, em ferramentas mais específicas de *design* gráfico, hoje em dia, muito importante, no contexto do *Marketing Digital*.

2.4.3. Pouco contacto com outros Departamentos e no próprio Departamento

O DMK desenvolve materiais sujeitos a demonstração de *compliance*, cujo conteúdo é avaliado pelo departamento médico, jurídico e regulamentar. Apesar disto, enquanto estagiária o meu contacto com outros departamentos foi escasso, o que considero um ponto fraco, por não me permitir ficar a par do âmbito de atuação dos restantes departamentos e do GTM no seu todo. Considero que esta não é uma responsabilidade do GTM, até porque esta necessidade de contacto não seria sentida, caso tivesse adquirido conhecimento prévio da realidade de indústria. Para além disto, a interação com os restantes gabinetes (hospitalar, genéricos e *consumer healthcare*) do departamento também foi escassa, situação que se explica, a meu ver, por uma questão de organização. Visto que, numa empresa de elevadas dimensões não é rentável ter um estagiário a mudar constantemente de área de trabalho. No entanto, apesar da apresentação inicial dos vários gabinetes, sinto que gostava de ter ficado a conhecer melhor em que consiste o trabalho dos mesmos.

2.5. Ameaças

2.5.1. Concorrência de Profissionais de outras áreas

Ao longo do estágio, especialmente durante o congresso e as várias formações em que participei percebi, que a maioria dos DIMs e CRVs não são pessoas formadas em Ciências Farmacêuticas, mas sim noutras áreas da saúde, como por exemplo: Psicologia, Imagiologia, etc. Situação que me impressionou, pois achava que a realidade era contrária, ou seja, a maioria destes profissionais eram farmacêuticos. No entanto, considero que os farmacêuticos, têm muito mais facilidade, quer na aquisição de conhecimentos, quer na transmissão destes aos médicos que pretendem influenciar, não querendo com isto desvalorizar outros profissionais, mas antes destacar que não obstante a qualidade da nossa

formação, a presença farmacêutica na indústria ainda é escassa. O que na minha opinião, deve ser alvo de atenção. De salientar que, no gabinete de Inovadores, alguns PMs são farmacêuticos, mas não todos, sendo a proporção destes profissionais no DMK do GTM ainda reduzida.

3. Considerações Finais

Na minha opinião a realização de parte do meu estágio curricular no seio do GTM, foi uma mais-valia. Não só porque se tratou da minha primeira experiência em indústria farmacêutica, mas também pelo próprio reconhecimento do GTM a nível nacional e internacional. Como primeira experiência permitiu-me conhecer o contexto de indústria farmacêutica, a sua estrutura, as várias áreas de trabalho e de atuação da mesma, isto tudo, mesmo tendo o meu estágio ocorrido apenas no DMK. Por outro lado, por ser uma empresa de dimensão considerável, muito superior àquelas onde já havia tido experiências, fez-me ter a noção da imensidão que é o mercado farmacêutico, da competitividade que se sente neste contexto, quer entre empresas, quer a nível individual. Fez-me entender o que é o verdadeiro mercado de trabalho e o que são relações profissionais, porque acho que a nível de farmácia comunitária as relações entre colegas são muitos menos formais que no contexto de indústria, isto explica-se talvez, por numa farmácia o número de colaboradores ser inferior, assim como o número de dígitos com que se trabalha, o que acarreta diferentes níveis de responsabilidade.

Considero também, que aprendi a ser uma futura profissional de indústria, pois ao observar de perto o trabalho da minha tutora, entendi que para se ser bem-sucedido nesta área é necessária uma colossal organização de trabalho, para que nenhum assunto, nem o menos importante fique esquecido. Aditivamente, percebi que numa grande organização, resultados são a palavra de ordem, porém ninguém obtém resultados sozinho, mas sim, sendo uma peça fulcral para o funcionamento de uma grande máquina.

Nesta empresa, não tenho qualquer dúvida que contactei com profissionais de sucesso, e o que mais me impressionou nas suas carreiras é que, muitos deles, apesar de serem formados em Gestão, Marketing ou Economia, tratam um IECA (inibidor da enzima de conversão da angiotensina) por “tu”. E na minha opinião esta globalidade de conhecimentos, é a chave para o sucesso, pois tal como um professor da FFUC diz “Quem só de Farmácia sabe, nem de Farmácia sabe!”.

Concluo que este estágio foi, sem dúvida, uma experiência profissional gratificante, contribuindo certamente para o meu futuro como farmacêutica.

4. Bibliografia

1. TECNIMEDE – **TECNIMEDE**. [Acedido a 20 julho 2021] Disponível na Internet:
<https://www.tecnimede.com/pt/>

5. Anexo

Tabela I: Tabela Resumo da Análise SWOT

	Fatores Positivos	Fatores Negativos
Fatores Internos	Strengths (Pontos Fortes) Acolhimento e Integração Condições de Trabalho Autonomia de Trabalho Diversidade e relevância de tarefas Infraestruturas Conhecimentos de Inglês e em Microsoft Excel® Facilidade de apreensão de conhecimentos	Weaknesses (Pontos Fracos) Escassa adequação do Mestrado Integrado à realidade de Indústria Farmacêutica Falta de conhecimentos Informáticos Pouco contacto com outros Departamentos e no próprio Departamento
Fatores Externos	Opportunities (Oportunidades) Voto de confiança Participação em Congresso e em Formações	Threats (Ameaças) Concorrência de Profissionais de outras áreas

Lista de Abreviaturas

CAR - Recetor quimérico de antigénio

CCL - ligando de quimiocina

CCR - recetor de quimiocinas

CRS - síndrome de libertação de citocinas

CSF - fator estimulante de colónias

ECM - matriz extracelular

FcR γ - subunidade γ comum dos recetores de Fc

GFP - proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*)

HER2 - recetor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (*human epidermal growth factor receptor 2*)

IIC - inibidores de *imuno checkpoints*

IL - Interleucina

iPSC - células estaminais pluripotentes induzidas (*induced pluripotent stem cell*)

IV - intravenosa

MEGF10 - multiple EGF like domains 10

MERTK - MER proto-oncogene, tyrosine kinase

MHC - Complexo Major de Histocompatibilidade

MMP - Metaloproteínase da matriz

NK - *Natural Killer*

NKT - *Natural Killer T*

NSGS - *NOD-scid IL2R γ null-3/GM/SF*

PCDH - *protocadherin*

scFv - fragmento variável de cadeia única

TAM - macrófago associado ao tumor

TCR - recetor de células T

TLR - *Toll - Like Receptor*

TME - microambiente tumoral

UTD - não transduzido

Resumo

Com o objetivo de encontrar uma alternativa terapêutica viável para o tratamento de tumores sólidos, macrófagos alterados geneticamente para expressar um recetor quimérico de antígeno (CAR) são atualmente foco de atenção. Esta terapêutica consiste na recolha de macrófagos do doente e na sua combinação *ex-vivo* com um CAR, são obtidos CAR-Ms, por sua vez reintroduzidos no doente, onde vão exercer efeito.

Dados de ensaios pré-clínicos demonstram características vantajosas dos CAR-M, como a capacidade de processar antígenos tumorais e apresentá-los às células T, exercer ação imunitária local durante um longo período de tempo, desencadear vias fagocíticas, converter macrófagos M2 em M1 e diminuir a carga tumoral.

Apesar das vantagens apresentadas, as terapias com CAR-Ms apresentam algumas desvantagens essencialmente a nível de efetividade.

Este trabalho apresenta uma contextualização da aplicação terapêutica de CAR-M, assim como alguns dos pontos-chave relacionados com os CAR-Ms, nomeadamente os processos de obtenção de macrófagos, os resultados de ensaios pré-clínicos e as várias aplicações terapêuticas possíveis.

Palavras-chave: Imunoterapia, Macrófagos, CAR, CAR-M, Tumores Sólidos.

Abstract

In order to find an effective therapeutic strategy for the treatment of solid tumors, genetically modified macrophages expressing a chimeric antigen receptor (CAR) are currently being developed. This therapy consists in harvesting macrophages from a patient and combining them *ex-vivo* with a CAR, CAR-Ms are obtained and readministered into the patient, where they will exert an effect.

Data from pre-clinical trials demonstrate advantageous characteristics of CAR-Ms, such as the ability to process tumor antigens and present them to T cells, exert local immune action over a long period of time, trigger phagocytic pathways, convert M2 macrophages into M1 and decrease tumor burden.

Despite the advantages presented, CAR-Ms present some disadvantages essentially of effectiveness.

This review presents a background of the therapeutic application of CAR-Ms, as well as some of the key points related to CAR-Ms, namely the processes for obtaining macrophages, the results of pre-clinical trials and the possible therapeutic applications.

Keywords: Immunotherapy, Macrophages, CAR, CAR-M, Solid Tumors.

Índice de Figuras

Figura 1: Desenvolvimento e homeostasia de macrófagos em murganhos.....	39
Figura 2: Estrutura de CAR-T de 1. ^a , 2. ^a e 3. ^a gerações.....	46
Figura 3: Estrutura dos vários tipos de CAR-T de 4. ^a geração.....	47
Figura 4: Estrutura de CAR-M patenteada em 2017.....	52
Figura 5: Imagem esquemática do processo de produção e utilização de CAR-Ms.	56
Figura 6: Atividade dos CAR-M.....	59

Índice de Tabelas

Tabela 1: Alternativas para a obtenção de macrófagos.....	41
Tabela 2: Contribuição dos TAMs para a progressão tumoral.....	43
Tabela 3: Estratégias que podem ser utilizadas para combater o efeito dos TAM	44
Tabela 4: CAR-M construídos até hoje.....	54
Tabela 5: Patologias elegíveis para a aplicação de CAR-M.	71

I. Introdução

A imunoterapia do cancro ou imuno-oncologia (XU *et al.*, 2019) visa estimular células imunitárias a combater células cancerígenas (ZHANG *et al.*, 2019), ou seja, ativa o sistema imunitário do hospedeiro (MILLING *et al.*, 2017), para destruir estas células (Xu *et al.*, 2019).

Durante um longo período de tempo a imunoterapia do cancro apresentou resultados desfavoráveis (MILLING *et al.*, 2017), porém imunoterapias desenvolvidas e utilizadas recentemente têm-se demonstrado benéficas, exemplos destas terapias são o bloqueio de imuno *checkpoints* (IC) e a terapia celular adaptativa (ACT) (ZHANG *et al.*, 2019).

A terapia com células CAR-T é um exemplo de ACT que gerou excelentes resultados em tumores hematológicos, no entanto a sua aplicação no tratamento de tumores sólidos enfrenta algumas dificuldades (KLICHINSKY *et al.*, 2020), situação que, associada à ambição de uma terapia mais segura, estimulou a utilização de outras células do sistema imunitário como terapêutica. Os macrófagos foram foco de atenção graças à sua plasticidade funcional (KLICHINSKY *et al.*, 2020), ao facto de serem potentes efetores do sistema imunitário e à sua capacidade única de penetração em tumores sólidos (KLICHINSKY *et al.*, 2020). A associação de CARs a macrófagos foi, então, alvo de investigação. Esta tecnologia consiste na utilização de macrófagos que, depois de associados a CARs, são injetados nos doentes (KLICHINSKY *et al.*, 2020). Estudos pré-clínicos e clínicos foram iniciados e, apesar dos dados ainda serem limitados, resultados promissores já foram divulgados.

2. Macrófagos

Os macrófagos são efetores do sistema imune inato (MORRISSEY *et al.*, 2018) e desempenham um papel central na comunicação entre este sistema e o sistema imune adaptativo (KLICHINSKY *et al.*, 2020).

A maioria dos macrófagos residentes dos tecidos derivam de células do saco vitelino, durante o desenvolvimento embrionário, e depois da gastrulação de células do fígado fetal (LEE *et al.*, 2016), com exceção dos macrófagos da mucosa intestinal e do baço, que derivam dos monócitos circulantes gerados a partir de sucessivas etapas (LAVIN *et al.*, 2013). No desenvolvimento pós-natal de macrófagos, a diferenciação ocorre devido à ação do fator estimulante de colónia (CSF)1 ou CSF2 (BAZZI *et al.*, 2017) e interleucina (IL) 34 (STANLEY *et al.*, 2014). Em condições homeostáticas as populações de macrófagos são mantidas por auto-renovação (LEE *et al.*, 2016). Em ambientes de elevada antigenicidade, a renovação é

executada por monócitos derivados da medula, que se diferenciam em macrófagos específicos do tecido (LEE *et al.*, 2016), porém há ocasiões em que as duas situações ocorrem em simultâneo (LEE *et al.*, 2016).

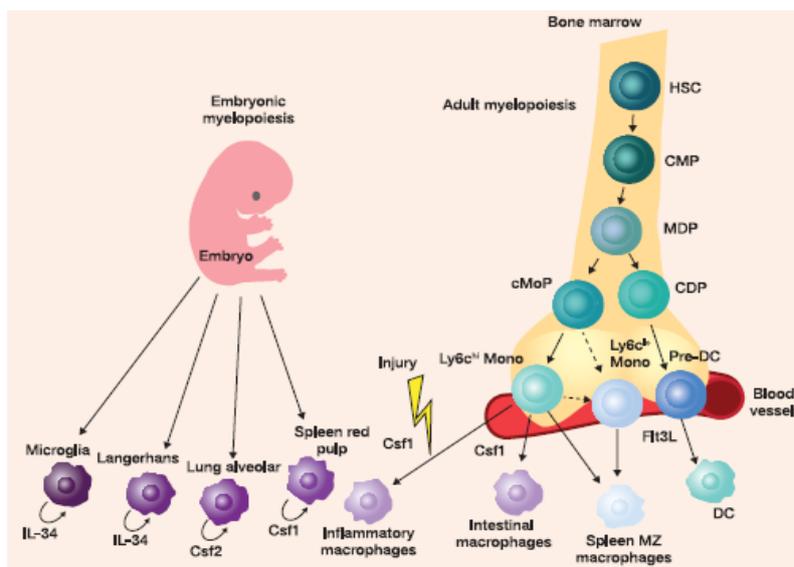


Figura 1: Desenvolvimento e homeostasia de macrófagos em murganhos (Adaptada de LAVIN *et al.*, 2013).

Os macrófagos residentes dos tecidos desempenham papéis críticos nos órgãos em que se localizam (LEE *et al.*, 2016), tendo funções relativamente diferentes mediante o ambiente em que se encontram (O'NEILL *et al.*, 2017). Este tipo de macrófagos é responsável por vigiar os tecidos, quando detetam microrganismos estranhos produzem mediadores químicos que induzem resposta inflamatória e desencadeiam uma resposta imunológica, permitindo manter a homeostase tecidual (LEE *et al.*, 2016). Ao contrário dos linfócitos, que exercem citotoxicidade antitumoral direta, os macrófagos participam na resposta imune inata, atuando como agentes fagocíticos (ZHANG *et al.*, 2019) ou como células apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais (KLICHINSKY *et al.*, 2020).

É importante compreender que os macrófagos possuem enorme plasticidade (LEE *et al.*, 2016), alterando-se em resposta a estímulos (KLICHINSKY *et al.*, 2020), ação designada polarização (LEE *et al.*, 2016). A polarização é descrita essencialmente em duas categorias: macrófagos pró-inflamatórios (LEE *et al.*, 2016) classicamente ativados (O'NEILL *et al.*, 2017), designados M1 e macrófagos anti-inflamatórios (LEE *et al.*, 2016), ativados alternativamente (O'NEILL *et al.*, 2017), designados M2 (LEE *et al.*, 2016). Os macrófagos M1 promovem uma resposta Th1 através da secreção de citocinas pró-inflamatórias (O'NEILL *et al.*, 2017) e constituem uma potente arma do sistema imunitário no combate a infecções, controlo de metástases e supressão do crescimento tumoral (O'NEILL *et al.*, 2017). Os macrófagos M2 têm um papel crítico na função imunológica e estimulação de respostas Th2 (MARTINEZ *et al.*, 2014). Atualmente os mecanismos de polarização *in vivo* são em parte desconhecidos. *In*

vitro, sabe-se que o fenótipo dos macrófagos tem características plásticas (O'NEILL *et al.*, 2017), para além disso, nos últimos anos uma classificação mais complexa tem vindo a surgir em detrimento do paradigma M1/M2 (LEE *et al.*, 2016).

Os macrófagos caracterizam-se por expressarem marcadores (O'NEILL *et al.*, 2017). Os M1 são descritos por apresentar essencialmente CD80 e CD86 (ZHANG *et al.*, 2019) e os M2, CD163 ou CD206 (FINKERNAGEL *et al.*, 2016). (Anexo: Tabela 1)

2.1. Ensaios e características ímpares dos macrófagos

No passado, macrófagos autólogos foram utilizados para o tratamento de vários tumores em ensaios clínicos, tendo demonstrado benefícios terapêuticos, mas não remissões duradouras (LEE *et al.*, 2016). Posteriormente estudos demonstraram que os macrófagos são parte integrante da resposta a tratamentos baseados em anticorpos, sendo a sobrevivência menor em caso de depleção de macrófagos (BIJ *et al.*, 2010).

Recentemente chegou-se à conclusão que a matriz extracelular (ECM) dos tumores é essencial para a sua progressão, esta matriz resulta de interações extremamente organizadas entre várias moléculas (ZHANG *et al.*, 2019), servindo como barreira física às terapêuticas. Os macrófagos têm capacidade de desempenhar várias funções, nomeadamente a secreção de substâncias, tais como moléculas citotóxicas, fatores pró-inflamatórios e metaloproteínases da matriz (MMPs), que, por sua vez são capazes de degradar grande parte dos componentes da ECM (ZHANG *et al.*, 2019). Assim sendo, os macrófagos são excecionalmente capazes de penetrar nos tumores sólidos, enquanto outras células imunitárias são fisicamente excluídas ou inativadas (MORRISSEY *et al.*, 2018; NIU *et al.*, 2020). Desta forma, a presença de macrófagos é crucial para o crescimento, progressão do tumor e definição do prognóstico (O'NEILL *et al.*, 2017).

2.2. Métodos de produção de macrófagos

Para utilizar macrófagos como terapêutica, é necessária a sua prévia obtenção. Até ao momento várias técnicas foram empregues neste processo. Os macrófagos derivados de monócitos (MDM) têm sido largamente usados, no entanto, apresentam algumas desvantagens. Outras células usadas são os macrófagos residentes dos tecidos, cuja utilização se demonstrou eficaz mas não ideal, pois os macrófagos podem manter a expressão genética do hospedeiro após isolamento e o número de células obtido não é significativo (BERNARREGGI *et al.*, 2019). Para ultrapassar estes problemas a solução tem sido a utilização de células pluripotentes (BERNARREGGI *et al.*, 2019). Adicionalmente, vários estudos utilizaram células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs) e células estaminais

embrionárias (ESCs) de murganho para produzir macrófagos *in vitro* (BERNARREGGI *et al.*, 2019), método este que revelou vantagens. Também iPSCs humanas foram utilizadas para gerar populações homogêneas de células mieloides (BERNARREGGI *et al.*, 2019), tendo sido conseguida rápida produção de grande número de macrófagos e dos seus progenitores (BERNARREGGI *et al.*, 2019).

Tabela I: Alternativas para a obtenção de macrófagos.

Células utilizadas	Vantagens	Desvantagens	Referências
MDM		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Características específicas do dador (pouco suscetíveis a manipulação genética); ▪ Grandes quantidades de sangue; ▪ Devolução dos macrófagos aos dadores; ▪ Curto tempo de vida. dos monócitos, <i>in vitro</i>. 	(BERNARREGGI <i>et al.</i> , 2019; LEE <i>et al.</i> , 2016),
Macrófagos residentes dos tecidos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Método eficaz. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Expressão genética do hospedeiro; ▪ Difícil obtenção de n.º significativo de células 	(BERNARREGGI <i>et al.</i> , 2019)
Células pluripotentes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Capacidade proliferativa ilimitada. 		(ZHANG <i>et al.</i> , 2020)
iPSCs e ESCs	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Uma célula do dador consegue gerar elevado n.º de células progenitoras; ▪ Célebre velocidade de divisão das células progenitoras; ▪ Células derivadas de hESCs são similares às células “normais” do sangue. 		(BERNARREGGI <i>et al.</i> , 2019; LEE <i>et al.</i> , 2016)
iPSCs humanas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Populações homogêneas de células mieloides; ▪ Rápida produção de macrófagos e dos seus progenitores. 		(BERNARREGGI <i>et al.</i> , 2019)

Legenda: ESCs: células estaminais embrionárias; hESCs: células estaminais embrionárias humanas; iPSCs: células estaminais pluripotentes induzidas; MDM: macrófagos derivados de monócitos; n.º: número.

2.3. Macrófagos no Microambiente Tumoral

O microambiente tumoral (TME) é uma estrutura complexa constituída por grande variedade de células imunossupressoras (KLICHINSKY *et al.*, 2020), designadamente: macrófagos associados ao tumor (TAMs), células T reguladoras (Tregs), *natural killer* (NK), células mieloides supressoras (MDSCs), entre outras, que evitam a presença de células T endógenas e reduzem a apresentação de antígenos (MOYES *et al.*, 2017). Na sua constituição estão também presentes: ECM, fatores solúveis (KIM *et al.*, 2015), fibroblastos e células vasculares endoteliais. O seu principal componente são células imunitárias (TENG *et al.*, 2016), nomeadamente macrófagos (KLICHINSKY *et al.*, 2020) responsáveis pela presença de cerca de 50% dos leucócitos no TME (ZHANG *et al.*, 2019).

O TME é caracterizado por um microambiente inflamatório, que promove instabilidade genética levando ao desenvolvimento de células tumorais epiteliais (GRIVENNIKOV *et al.*, 2012) e ao recrutamento de células imunes, nomeadamente mieloides (KLICHINSKY *et al.*, 2020). Desta forma, o TME protege o tumor da ação do sistema imunitário e proporciona o aumento da angiogénese e da invasão tumoral (KLICHINSKY *et al.*, 2020), contribuindo para o crescimento da neoplasia (O'NEILL *et al.*, 2017).

Os objetivos futuros são reconhecer os mecanismos utilizados pelos tumores para superar terapias imunomoduladoras e definir com precisão a composição do TME (NYWENING *et al.*, 2018).

2.4. TAMs, alvos no cancro: Redução e Reprogramação

Macrófagos derivados da medula (LEE *et al.*, 2016) e macrófagos residentes dos tecidos são recrutados pelo TME (ZHANG *et al.*, 2019) e polarizados num fenótipo M2, imunossupressor e pró-tumoral, denominados TAMs (KLICHINSKY *et al.*, 2020), que aumentam a malignidade do tumor (LEE *et al.*, 2016).

A maioria dos TAMs são recrutados a partir do sangue periférico, o que indica que os macrófagos injetados podem impregnar-se nos tumores (ZHANG *et al.*, 2019). O CSFI é o principal responsável pela atração de macrófagos para a periferia tumoral. Após localização na periferia tumoral, os macrófagos são regulados por um processo de *angiogenic switch*, através do qual o tumor se torna metastático. Caso não existam macrófagos na periferia tumoral este processo não ocorre (O'NEILL *et al.*, 2017). Para além de *angiogenic switch*, ocorre transição epitelial-mesenquimal (EMT) (DENG *et al.*, 2016), em que as células

cancerígenas perdem as propriedades epiteliais, adquirem um fenótipo mesenquimal, capacidade invasiva e há redução da adesão intercelular (SU *et al.*, 2014).

Resumidamente, os TAMs são as principais células imunossupressoras do TME (O'NEILL *et al.*, 2017), distinguem-se de outras populações de macrófagos (FINKERNAGEL *et al.*, 2016) por contrariarem a ação dos macrófagos pró-inflamatórios (DENG *et al.*, 2016) e contribuírem para a progressão tumoral.

Tabela 2: Contribuição dos TAMs para a progressão tumoral.

Direta	Indireta	Referências
<p>Promoção de:</p> <ul style="list-style-type: none"> • instabilidade genética; • angiogênese; • metastização; • imunossupressão; • exclusão de linfócitos; • aderência e invasão das células tumorais; • extravasão e migração das células tumorais. 	<ul style="list-style-type: none"> • inibição das respostas à imunoterapia. 	<p>(ADAMS <i>et al.</i>, 2014; ANDERSON <i>et al.</i>, 2020; FINKERNAGEL <i>et al.</i>, 2016; GYORI <i>et al.</i>, 2018; MOK <i>et al.</i>, 2014; YANG <i>et al.</i>, 2017)</p>

Supletivamente, os TAMs são um elo de ligação entre a inflamação e o cancro (GRIVENNIKOV *et al.*, 2012) e começaram também a ser vistos como potenciais biomarcadores para diagnóstico (WANG *et al.*, 2015) e prognóstico do cancro, assim como alvos terapêuticos (YANG *et al.*, 2015).

Interferências na polarização podem converter macrófagos M2 em M1 e facilitar a supressão tumoral (DENG *et al.*, 2016). Terapêuticas que repolarizem, diminuam ou desinibam a atividade fagocítica dos TAMs estão atualmente em desenvolvimento clínico (KLICHINSKY *et al.*, 2020).

Para combater o efeito dos TAMs, várias estratégias podem ser utilizadas, nomeadamente redução do número de TAMs ou repolarização (KLICHINSKY *et al.*, 2020).

Tabela 3: Estratégias que podem ser utilizadas para combater o efeito dos TAM.

Redução do número de TAMs	Repolarização dos TAMs	Referências
<p>Através de:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bloqueio da diferenciação de monócitos; • Inibição do recrutamento adicional de monócitos; • Diminuição da sobrevivência dos TAMs; • Eliminação de TAMs existentes. 	<p>Através de:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bloqueio de sinais anti-fagocitários; • Indução de vias de sinalização pró-inflamatórias nos TAMs. 	<p>(ANDERSON <i>et al.</i>, 2020; PYONTECK <i>et al.</i>, 2013; STANLEY <i>et al.</i>, 2014)</p>

Legenda: TAMs: macrófagos associados ao tumor.

O bloqueio da ligação CSF1/ recetor do fator estimulantes de colónias (CSF1R) é o método mais estudado para a redução da sobrevivência dos TAMs (STANLEY *et al.*, 2014). Este tratamento não é totalmente eficaz, pois pode ser compensado pelo aumento da sinalização de outras vias pró-sobrevivência ou pela atividade das Tregs no TME (GYORI *et al.*, 2018), no entanto, induz a repolarização dos TAMs para M1 (PYONTECK *et al.*, 2013) e a dupla inibição (CSF1/CSF1R e Treg) tem potencial para ser uma imunoterapia eficaz (GYORI *et al.*, 2018). É importante notar que a falta de eficácia desta técnica é comum a todas as técnicas que impliquem depleção de TAMs no ambiente tumoral, devido à resposta compensatória de outros subtipos de células mieloides, podendo pôr em causa os benefícios atingidos com a prévia depleção (NYWENING *et al.*, 2018).

Resumidamente, para atingir um tratamento tumoral efetivo, é fundamental combinar terapêuticas convencionais com terapias que têm os TAMs como alvo, visto que as terapias convencionais levam a um aumento local de células mieloides, o que favorece a progressão tumoral (NYWENING *et al.*, 2018).

3. CARs

CARs são recetores transmembranares (MORRISSEY *et al.*, 2018) recombinantes (O'NEILL *et al.*, 2017), elaborados em laboratório que redirecionam a atividade celular (MORRISSEY *et al.*, 2018) para antígenos específicos (ZHANG *et al.*, 2019), contribuindo para o surgimento de uma resposta imunológica (MORRISSEY *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2019). Embora as células T tenham sido o foco da investigação com CARs, a utilização destes recetores foi alargada a outras células do sistema imunitário, tais como NK, *natural killer T* (NKT), $\gamma\delta$ T e macrófagos. Estas células, para além das capacidades comuns às células

T, possuem funções imunes inatas, com consequente capacidade aumentada de destruir o tumor. Adicionalmente, demonstraram desencadear menos efeitos secundários, comparativamente às células T (BERNARREGGI *et al.*, 2019; CAPSOMIDIS *et al.*, 2018; KLICHINSKY *et al.*, 2020; O'NEILL *et al.*, 2017), uma vez que possuem mecanismos de morte celular que diminuem as reações de autoimunidade (LIN *et al.*, 2019).

3.1. Células CAR-T

As células CAR-T, também designadas *artificial T cell receptors* (O'NEILL *et al.*, 2017), foram apresentadas pela primeira vez em 1989 (ZHANG *et al.*, 2019), por Zelig Eshhar (LEE, 2019), são células T autólogas, nas quais é introduzido um CAR (O'NEILL *et al.*, 2017).

Inicialmente é estabelecido o alvo das células CAR-T, seguidamente um fragmento variável de cadeia única (scFv) substitui o domínio extracelular do recetor de células T (TCR), o scFv reconhece o alvo de forma dependente do complexo *major* de histocompatibilidade (MHC) (O'NEILL *et al.*, 2017), liga-se e desencadeia cascatas de sinalização que ativam as células T (O'NEILL *et al.*, 2017). Células CAR-T reconhecem antigénios específicos, nomeadamente o CD19, tipicamente expresso à superfície de células B e tumores derivados destas (MORRISSEY *et al.*, 2018). Por esta razão, o sucesso da imunoterapia com células CAR-T tem estado associado à sua utilização em tumores hematológicos (ZHANG *et al.*, 2019). Inúmeros ensaios clínicos estudam a utilização de células CAR-T direcionadas a outros marcadores tumorais e atualmente existem já cinco fármacos aprovados pela FDA (Breyanzi[®], Abecma[®], Tecartus[™], Yescarta[®], Kymriah[™]) (FDA, [s.d.]).

A utilização de células CAR-T no tratamento de tumores sólidos não apresentou evolução significativa (ZHANG *et al.*, 2019), pois um dos requisitos para haver efeito antitumoral é as células CAR-T atingirem o tumor. Esta situação ocorre quando as células efectoras penetram no tecido do estroma, barreira física à entrada de células T (ANDERSON *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2019). Mesmo depois da entrada no TME, as células efectoras encontram condições desfavoráveis (MOON *et al.*, 2014). Caso as CAR-T sobrevivam ao TME, há uma terceira “barreira” a ultrapassar, a expressão heterogénea de antigénios tumorais, que pode levar à deteção da invasão pelas CAR-T e escape de células tumorais antigénio negativas (SONG *et al.*, 2021). Outro motivo para a falha desta terapêutica em tumores sólidos é a exaustão das células imunitárias (BREMPELIS *et al.*, 2020) e a qualidade das células T, pois em terapias autólogas esta depende das condições do doente (SINGH *et al.*, 2016). Têm sido feitos estudos no sentido de possibilitar a utilização de células CAR-T no tratamento de tumores sólidos, resultados positivos foram alcançados com a utilização de

células CAR-T associadas a proteínas ativadoras de fibroblastos em modelos animais (ZHANG *et al.*, 2019) e com tratamento fototérmico (CHEN *et al.*, 2019).

Apesar das células CAR-T parecerem benéficas é importante ter em conta que os processos de produção personalizados implicam elevados custos (RATAJCZAK, 2019). Para além disso, as células T podem viver durante um período de tempo indefinido, logo as CAR-T podem permanecer ativas após tratamento e desaparecimento do tumor, o que origina uma síndrome de libertação de citocinas (CRS) (O'NEILL *et al.*, 2017). A CRS é um evento tóxico habitualmente associado à utilização de células CAR-T clássicas, podendo levar (ZHANG *et al.*, 2019) à ativação descontrolada das células do sistema imunitário (O'NEILL *et al.*, 2017) e ao direcionamento de células T para locais que não o tecido tumoral (ZHANG *et al.*, 2019), ocorrendo efeitos secundários que podem pôr a vida em risco (ZHANG *et al.*, 2019). Associada à CRS é frequente a ocorrência de neurotoxicidade (KAGOYA *et al.*, 2018).

Atualmente existem quatro gerações de CAR-T. As CAR-T de 1.^a geração contêm um fragmento extracelular, constituído por um scFv que reconhece antígenos do tumor (MORRISSEY *et al.*, 2018), contém também um espaçador, uma região *hinge*, uma região transmembranar (OLIVEIRA *et al.*, 2013) e um domínio de ativação de células T, constituído geralmente pela cadeia CD3 ζ (KAGOYA *et al.*, 2018). Na 2.^a geração foi adicionado um domínio intracelular co-estimulatório, para ativação completa das células T (LIU *et al.*, 2017) sendo assim mais eficazes na ativação de alvos específicos (OLIVEIRA *et al.*, 2013). A 3.^a geração apresenta dois domínios co-estimulatórios para maximizar a proliferação e produção de citocinas e a ativação das células T (LIU *et al.*, 2017). Tanto a 2.^a como a 3.^a geração foram desenvolvidas para aumentar a persistência das CAR-T *in vivo*, os seus efeitos antitumorais e diminuir os efeitos secundários (GUEDAN *et al.*, 2018).

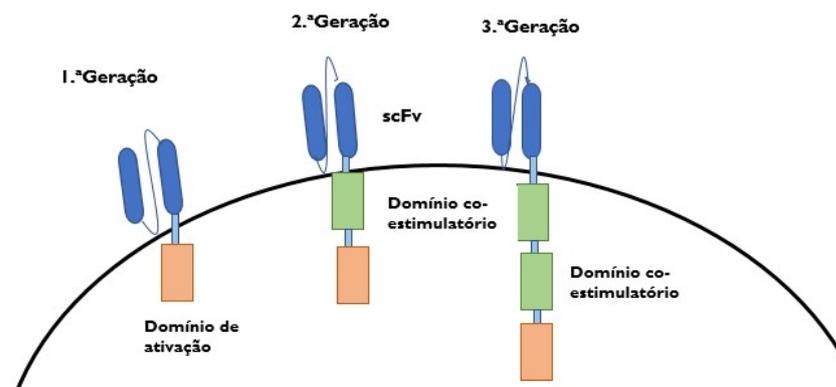


Figura 2: Estrutura de CAR-T de 1.^a, 2.^a e 3.^a gerações (Adaptada de NATIONAL CANCER INSTITUTE, [s.d.])

No sentido de colmatar as desvantagens e dificuldades apresentadas pelas CAR-T de 2.^a e 3.^a geração (OKAMOTO *et al.*, 2020) e aumentar a segurança e versatilidade do tratamento, surgiu a 4.^a geração de CAR-T (KAGOYA *et al.*, 2018). A 4.^a geração contém domínios funcionais adicionais, com objetivo de melhorar as funções das células T (LIU *et al.*, 2017). Para evitar a ocorrência de efeitos secundários resultantes do direcionamento de CAR-T para tecidos normais foi desenvolvido o duplo sistema CAR, no qual um recetor *Notch* sintético deteta um antígeno, levando à indução da expressão de um segundo CAR, que reconhece outro antígeno, permitindo maior precisão terapêutica e utilização numa gama mais vasta de tumores (ROYBAL *et al.*, 2016). Com o objetivo de aumentar a segurança das CAR-T, surgiu a *split, universal, and programmable* (SUPRA) (CHO *et al.*, 2018) que integra sinais de vários antígenos ativando as células T de forma específica (CHO *et al.*, 2018). Outro tipo de CAR-T são as TRUCK em que, após deteção do antígeno, o fator nuclear das células T ativadas (NFAT) induz a expressão de IL12 (LEE, 2019). Outra categoria são as JAK-STAT CAR que demonstraram maior efeito antitumoral, persistência e ativação antígeno específica (OKAMOTO *et al.*, 2020). Existem ainda as CAR-T caspase 9 induzidas (iC9), sistema que elimina as CAR-T, melhorando a segurança das mesmas, pois contribui para diminuir a ocorrência de CRS (LIU *et al.*, 2017).

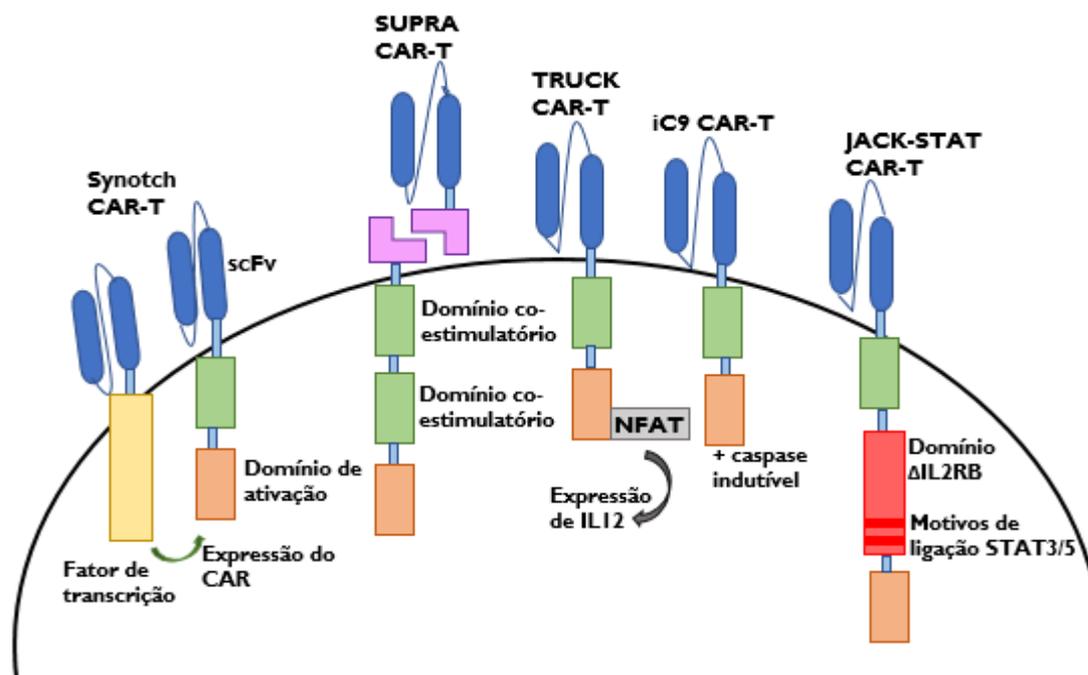


Figura 3: Estrutura dos vários tipos de CAR-T de 4.^a geração (Adaptada de KAGOYA *et al.*, 2018 e LEE, 2019).

3.2. Células CAR-NK

As células NK foram descritas pela primeira vez em 1970 (NOGRADY *et al.*, 2020) são linfócitos críticos para o sistema imune inato, já que constituem a primeira linha de defesa e são as principais células citotóxicas para as células tumorais (BERNARREGGI *et al.*, 2019). A sua atividade é regulada por recetores de inibição e ativação que reconhecem expressões alteradas de proteínas nas células alvo (BERNARREGGI *et al.*, 2019). A ligação dos recetores inibitórios às moléculas do complexo *major* de histocompatibilidade do tipo I (MHCI) impede a morte de células saudáveis por células NK. Estas células desencadeiam secreção de citocinas que regulam outras células do sistema imunitário, têm papel adjuvante na ação citotóxica e consequente inibição do crescimento tumoral (BERNARREGGI *et al.*, 2019).

Em comparação com as células CAR-T, as CAR-NK revelam-se vantajosas (KLINGEMANN, 2014). São menos dependentes do *human leukocyte antigen* (HLA) (NOGRADY, 2020), característica que facilita a sua produção, uma vez que as células obtidas podem ser imunologicamente diferentes das do doente (NOGRADY, 2020). Têm um tempo de vida mais curto e um perfil de segregação de citocinas mais seguro, podem desencadear citotoxicidade, sem prévio reconhecimento do antígeno (BERNARREGGI *et al.*, 2019), são capazes de exercer citotoxicidade independente do CAR (KLINGEMANN, 2014) e citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) (KLINGEMANN, 2014).

No entanto, são apontadas preocupações relacionadas com a utilização de CAR-NK, o curto tempo de vida, pode pôr em causa a eficácia, a sensibilidade à criopreservação, a diminuída eficiência de transdução e a baixa representatividade (NOGRADY, 2020). Outro entrave é a dificuldade no combate a tumores sólidos (ABUJAROUR *et al.*, 2021). Para além disto, caso obtidas por leucaférese, o tempo e gastos monetários implicados podem ser elevados (KLINGEMANN, 2014), dado que a percentagem de células NK no sangue periférico é pequena e a sua expansão para números clinicamente relevantes é uma dificuldade (KLINGEMANN, 2014). Estratégias para ultrapassar estes obstáculos têm sido estudadas, nomeadamente a produção de células NK a partir de células pluripotentes (BERNARREGGI *et al.*, 2019). Atualmente, está a ser estudada a obtenção de células NK a partir de células do cordão umbilical (BIANCA, 2020). Outra hipótese é a utilização de hESCs e de iPSCs (BERNARREGGI *et al.*, 2019), técnicas que parecem benéficas por permitir a produção sustentada e célere de células efetoras específicas para o alvo (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Apesar dos pontos positivos, as células obtidas podem apresentar instabilidade genética (RATAJCZAK, 2019), o que não acontece com a utilização de células

estaminais/progenitoras hematopoiéticas (HSPCs) (BIANCA, 2020; RATAJCZAK, 2019) que demonstram viabilidade e eficácia na geração de múltiplas linhagens de células efectoras (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Atualmente, vários estudos clínicos estão a decorrer, tendo demonstrado resultados positivos no tratamento de tumores hematológicos (BIANCA, 2020). A associação de CAR-NK a inibidores de imuno *checkpoints* (IIC) é também uma hipótese, uma vez que as células NK são reguladas e inativadas por IC que, se inibidos, levam a que as células NK passem a ativas e hiperfuncionais, podendo debelar o tumor de forma célere (BIANCA, 2020).

A terapia celular com CAR-NK tem vindo a ser alvo de avaliação, tendo-se revelado, até ao momento, mais barata e mais segura que as CAR-T (BIANCA, 2020).

3.3. Células CAR-NKT

Células NKT ostentam características das células T e NK (SMYTH *et al.*, 2000), expressam simultaneamente o TCR e recetores NK (SMYTH *et al.*, 2000) e reconhecem apenas antígenos lipídicos apresentados por moléculas CD1d (MHCI) (SMYTH *et al.*, 2000). As células NKT representam um elo de ligação entre a imunidade inata e adaptativa (SMYTH *et al.*, 2000), facilitando a resposta antitumoral através de vários mecanismos, como por exemplo, a inibição dos TAMs (SONG *et al.*, 2009). Dividem-se em dois subtipos, invariantes (iNKT) e diversas (dNKT) (WEBB *et al.*, 2020). As iNKT são mais prevalentes (SMYTH *et al.*, 2000) e apresentam maior atividade antitumoral (SONG *et al.*, 2009).

À semelhança das células CAR-NK, as CAR-NKT podem exercer citotoxicidade direta ou indireta (SONG *et al.*, 2009), atuando como fonte primária de citocinas que desencadeiam respostas imunes por parte de outras células (SONG *et al.*, 2009).

As células CAR-NKT são relevantes, dado que os CARs exacerbam a atividade antitumoral das iNKT (HECZEY *et al.*, 2014), a sua maior infiltração no tumor foi associada a melhores resultados clínicos (METELITSA *et al.*, 2004) e o reconhecimento antigénico restrito ao CD1d pode reduzir a toxicidade fora do alvo (HECZEY *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2009). Até à data, estudos pré-clínicos demonstraram viabilidade dos CARs para redirecionar as NKT e prolongar a sobrevivência global (HECZEY *et al.*, 2014), no entanto, apenas um ensaio clínico teve início, não sendo para já possível retirar conclusões sobre a sua aplicação terapêutica (HECZEY *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2019a). Não obstante, as CAR-NKT desempenham um papel fulcral na regulação da imunidade antitumoral, constituindo uma possível terapêutica futura.

3.4. Células CAR- $\gamma\delta$ T

$\gamma\delta$ T são um tipo de células T, com propriedades semelhantes às células imunes inatas (CAPSOMIDIS *et al.*, 2018) e adaptativas (DENIGER *et al.*, 2014). Expressam as cadeias γ e δ do TCR (CAPSOMIDIS *et al.*, 2018), através das quais reconhecem e destroem os tumores (CAPSOMIDIS *et al.*, 2018), são capazes de se infiltrar no TME e de atuar como APCs, após ativação (CAPSOMIDIS *et al.*, 2018), o que despertou interesse na sua transdução com CAR (CAPSOMIDIS *et al.*, 2018).

As células $\gamma\delta$ T dividem-se em vários subtipos e a aplicação do V γ 9V δ 2 em imunoterapia está a ser predominantemente explorada (CAPSOMIDIS *et al.*, 2018; DENIGER *et al.*, 2014). Estas células constituem uma alternativa segura quando ocorre CRS severa com CAR-T, já que $\gamma\delta$ TCRs não reconhecem auto-antígenos e conseqüentemente as células $\gamma\delta$ T não têm propensão para autoimunidade (LIN *et al.*, 2019).

Estudos pré-clínicos demonstram que as células $\gamma\delta$ T são capazes de exercer citotoxicidade sobre células tumorais (CAPSOMIDIS *et al.*, 2018), através da produção de citocinas e de ADCC (CAPSOMIDIS *et al.*, 2018) e que, após transdução com CAR podem expandir-se para números clinicamente relevantes, assim como apresentar citotoxicidade antígeno específica aumentada, mantendo as suas propriedades antitumorais inatas, nomeadamente a capacidade de apresentação cruzada de antígenos (CAPSOMIDIS *et al.*, 2018). A maior infiltração de $\gamma\delta$ T está associada a melhores prognósticos clínicos (CAPSOMIDIS *et al.*, 2018), revelando estas células maior aptidão de destruição tumoral que as CAR-T (CAPSOMIDIS *et al.*, 2018). Alguns ensaios clínicos tiveram início (BENNOUNA *et al.*, 2008), mas mais são necessários para provar a veracidade dos dados obtidos pré-clinicamente.

4. CAR-Ms

Estudos anteriores, nos quais macrófagos foram injetados em doentes com cancro apresentaram resultados que ficaram aquém, o que sugere que os macrófagos necessitam de sinais adicionais para exercer efeito sobre os tumores (MORRISSEY *et al.*, 2018). Esta informação associada à utilização limitada de células CAR-T em tumores sólidos e às características díspares dos macrófagos (NIU *et al.*, 2020), nomeadamente a sua capacidade de penetrar nestes tumores (MORRISSEY *et al.*, 2018), fez com que surgissem hipóteses de investigação de utilização de CARs associados a macrófagos (NIU *et al.*, 2020). Assim sendo, o desenvolvimento de CAR-Ms teve início no ano 2016 (O'NEILL *et al.*, 2017), em 2017 foi patenteada a sua estrutura e surgiu a designação de "MOTO-CAR" (O'NEILL *et al.*, 2017).

Para obter os macrófagos que posteriormente são associados aos CARs, podem ser utilizados monócitos, macrófagos residentes dos tecidos, hESC e iPSC (BERNARREGGI *et al.*, 2019), outra hipótese é a utilização de monócitos/macrófagos autólogos que são transduzidos *ex-vivo* com um vetor contendo os genes que codificam o CAR (O'NEILL *et al.*, 2017).

Construídos os CAR-Ms, os macrófagos passam a exercer funções dependentes de antígenos, como, a expressão e secreção de citocinas (RATAJCZAK, 2019) e são direcionados para fagocitar alvos específicos (MORRISSEY *et al.*, 2018), nomeadamente antígenos tumorais, como a timidina cinase I (TK1) e a hipoxantinaguanina fosforribosiltransferase (HPRT), pouco expressos em células normais (O'NEILL *et al.*, 2017). Pensa-se que no futuro poderão ser usados quaisquer marcadores antigénicos característicos de células tumorais que não estejam expressos em células normais, e, também, proteínas mutantes, produzidas pela massa tumoral ou em resultado à sua presença (O'NEILL *et al.*, 2017). Adicionalmente, os CAR-Ms têm capacidade de minimizar os efeitos imunossupressores do TME (KLICHINSKY *et al.*, 2020) e melhorar as respostas imunes inatas e adaptativas antitumorais (KLICHINSKY *et al.*, 2020).

Até ao momento a fagocitose mediada por CAR-Ms foi confirmada pré clinicamente contra tumores sólidos (KLICHINSKY *et al.*, 2020) e hematológicos (ANDERSON *et al.*, 2020). Apenas um ensaio clínico teve início, não tendo ainda sido obtidos quaisquer dados (KLICHINSKY *et al.*, 2020).

Os vários grupos de investigação estão associados às indústrias farmacêuticas *Translational Therapeutics* e *Carisma Therapeutics*. O grupo associado à *Carisma Therapeutics* foi o que atingiu maiores avanços até à data (KLICHINSKY *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2019).

4.1. Design de CAR-Ms

Os CAR-Ms patenteados possuem uma estrutura que consiste num scFv de um anticorpo monoclonal humano/humanizado manipulado através de engenharia genética, para se direcionar para antígenos específicos (O'NEILL *et al.*, 2017). O scFv é fundido através de um domínio transmembranar, com a região de ativação intracelular de um *toll-like receptor* (TLR) (O'Neill e Weber, 2017).

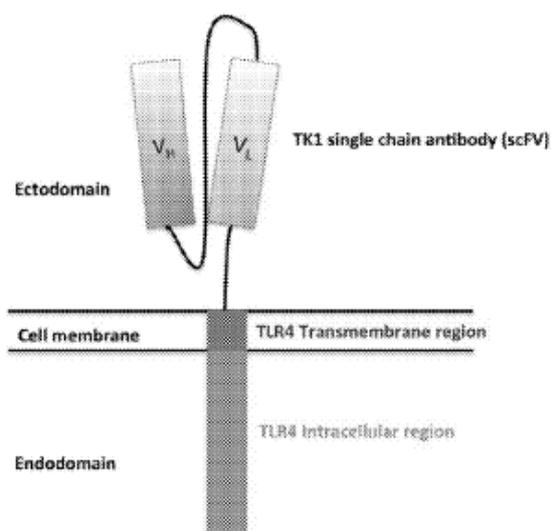


Figura 4: Estrutura de CAR-M (Adaptada de O'NEILL *et al.*, 2017).

Em termos gerais, todos os CAR-Ms consistem num domínio extracelular (NIU *et al.*, 2020), domínio *hinge* (KLICHINSKY *et al.*, 2020), domínio transmembranar e domínio intracelular (MORRISSEY *et al.*, 2018) responsável por ativar os macrófagos, por vezes os CAR-Ms possuem domínios de sinalização co-estimulatórios adicionais como parte dos domínios intracelulares (O'NEILL *et al.*, 2017). Para evitar problemas devido à ativação de CAR-Ms no soro, podem ser colocados sob controlo de um promotor específico (O'NEILL *et al.*, 2017).

Não obstante à estrutura patenteada, os diferentes grupos construíram diferentes tipos de CAR-Ms, com pequenas variações entre si. O domínio extracelular usado é geralmente um scFv, já que o reconhecimento pelos CAR-Ms é independente do MHC (KLICHINSKY *et al.*, 2020; O'NEILL *et al.*, 2017). No entanto há exceções, no caso do grupo de NIU *et al.* foi utilizado o ligando de quimiocina 19 (CCL19), ligando específico do recetor 7 de quimiocinas (CCR7), em vez de um scFv (2020). O domínio *hinge* e transmembranar utilizados têm sido, de forma geral, derivados do CD8. No que toca ao domínio intracelular, há algumas variações (NIU *et al.*, 2020), este pode ser a porção citoplasmática de um TLR, um recetor de CD16, IL1 ou INF γ (O'NEILL *et al.*, 2017), o domínio de ativação clássico (4-1BB-CD3 ζ) (NIU *et al.*, 2020) ou outros domínios identificados pelo grupo de MORRISSEY *et al.*, através de um *screening* de um conjunto de recetores fagocíticos de murinos (2018): *multiple EGF like domains 10* (MEGF10), *MER proto-oncogene, tyrosine kinase* (MERTK), subunidade γ comum dos recetores de Fc (FcR γ) e *BAl1* (MORRISSEY *et al.*, 2018). Os CAR-Ms foram designados de acordo com os seus domínios de sinalização intracelular e com os antigénios a que se dirigem. Células RAW264.7 e CAR-Ms que expressam vetores vazios foram designados CAR-M (*protocadherin* (PCDH)) (NIU *et al.*, 2020).

4.2. Diferentes tipos de CAR-Ms

Tal como referido no ponto anterior, vários foram os CAR-Ms concebidos pelos diversos grupos de investigação. O grupo de KLICHINKY *et al.* gerou o anti-HER2 CAR-M(CD3ζ) e o anti-mesotelina CAR-M(CD3ζ), com domínios extracelulares com afinidade para o recetor do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) (2020) e para a mesotelina (PRESS RELEASE, CARISMA THERAPEUTICS, 2021), respetivamente. A *Carisma Therapeutics* criou ainda anti-PSMA CAR-Ms que têm como alvo um antigénio presente na membrana de células neoplásicas da próstata (PRESS RELEASE, CARISMA THERAPEUTICS, 2021).

O grupo de ZHANG *et al.* produziu o anti-HER2 CAR-M(CD147), constituído por uma região extracelular que reconhece o HER2, uma região *hinge*, uma região transmembranar e uma região intracelular de CD147 (2019) utilizada para ativar a expressão de MMPs nos macrófagos (ZHANG *et al.*, 2019).

O grupo de MORRISEY *et al.* após *screening* dos recetores fagocíticos de murinos, construiu diferentes CAR-Ms, contendo diferentes domínios intracelulares (*MEGF10*, *FcRγ*, *BAl1* e *MERTK*). Este grupo criou também um CAR-M com um domínio citoplasmático expressando a proteína verde fluorescente (GFP), mas sem domínio de sinalização, para testar em que medida é que a adesão mediada pelo fragmento anti-CD19 é suficiente para desencadear fagocitose (2018).

O grupo de NIU *et al.* criou anti-CCR7 CAR-Ms, que direcionam os macrófagos para células CCR7+, pois detetou que grandes gotas lipídicas (LD^{hi}) CCR7^{hi} são uma população de células imunossupressoras que migram do tecido tumoral para órgãos distais (2020). Ao destruírem células CCR7+ os CAR-Ms prolongam a sobrevivência e suprimem o crescimento tumoral, por induzirem imunidade antitumoral, já que retardam a migração de células LD^{hi} CCR7^{hi} para órgãos distais e previnem a ocorrência de metástases (NIU *et al.*, 2020).

Tabela 4: CAR-M construídos até hoje

Designação	Domínio Extracelular	Domínio Transmembrantar	Domínio Intracelular/ citossólico	Referências
Anti-CD19 CAR-M (GFP)	anti-CD19 (Fab)	CD8	-	(MORRISSEY et al., 2018)
Anti-CD19 CAR-M (FcRy)	scFv anti-CD19 CAR	CD8	Precursor Fc ERG	
Anti-CD19 CAR-M ((MERTK)	scFv anti-CD19 CAR	CD8	MERTK	
Anti-CD19 CAR-M (BAI1)	scFv anti-CD19 CAR	CD8	BAI1	
Anti-CD19 CAR-M (MEGF10)	scFv anti-CD19 CAR	CD8	MEGF10	
Anti-CD22 CAR-M (MEGF10)	Antígeno quimérico M971 (Fab)	CD8	MEGF10	
Anti-CD19 CAR-M (tandem)	scFv anti-CD19 CAR	CD8	CD19 + Fc ERG	
Anti-CD19 CAR-M (PI3K)	scFv anti-CD19 CAR	CD8	CD19	
Anti-CD19 CAR-M (CD3ζ)	scFv anti-CD19 CAR	CD8	TCR CD3 ζ	
Anti-CD19 CAR	scFv anti-CD19 CAR	CD8	-	
Anti-CD22 CAR	Antígeno quimérico M971	CD8	-	
Anti-HER2 CAR-M(CD3ζ)	Anti-HER2	CD8	CD3ζ	(KLICHINSKY et al., 2020)
Anti-mesotelina CAR-M(CD3ζ)	Anti-mesotelina	CD8	CD3ζ	
Anti-CD19 CAR-M(CD3ζ)	Anti-CD19	CD8	CD3ζ	
Anti-CD19 CAR-M(CD3Δζ)	Anti-CD19	CD8	CDA3ζ	
Anti-CD19 CAR-M(Fcγ)	Anti-CD19	CD8	Fcγ	
Anti-CCR7 CAR-M (TLR2)	CCL19		TLR2	(NIU et al., 2020)
Anti-CCR7 CAR-M (TLR4)	CCL19		TLR4	
Anti-CCR7 CAR-M (TLR6)	CCL19		TLR6	
Anti-CCR7 CAR-M (MERTK)	CCL19		MERTK	
Anti-CCR7 CAR-M(4-1BB-CD3ζ)	CCL19		4-1BB-CD3ζ	
Anti-CCR7 CAR-M (PCDH)			PCDH	
Anti-HER2 CAR-M (CD147)	scFv Anti-HER2	CD147	CD147	(ZHANG et al., 2019)
Anti-TKI CAR-M(TLR4)	scFv Anti-TKI	TLR4	TLR4	(O'NEILL et al., 2017)
Anti-HPRT CAR-M(TLR4)	scFv Anti-HPRT	TLR4	TLR4	
Anti-CD19 CAR-M	Anti-CD19		4-1BB-CD3ζ	(ZHANG et al., 2020)
Anti-mesotelina CAR-M	Anti-mesotelina			
Anti-HER2 CAR-M	Anti-HER2			(GABITOVA et al., 2021)
Anti-HER2 CAR-M	Anti-HER2			(PIERINI et al., 2021)
Anti-PSMA CAR-M	Anti-PSMA			(PRESS RELEASE, CARISMA THERAPEUTICS, 2021)

Legenda: CAR: Recetor quimérico de antígeno; CCL: ligando de quimiocina; CCR: recetor de quimiocina; CD: Cluster of Differentiation; CD3ζ: Domínio CD3ζ truncado; Fab: Fragmento de ligação a antígenos; Fc: Fragmento cristalino; FcRy: subunidade y comum dos recetores de Fc; GFP: proteína verde fluorescente; HER2: recetor do fator de crescimento epidérmico humano 2; HPRT: Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase; iPSCs: células estaminais pluripotentes induzidas; M: Macrófagos; MEGF10: Multiple EGF-like domains 10; MERTK: MER proto-oncogene, tyrosine kinase; mGFP: GFP ligado à membrana; PI3K: Phosphoinositide 3-kinase; PSMA: Antígeno Específico da Membrana da Próstata; scFv: Fragmento variável de cadeia única; sGFP: superfolder GFP; TCR: recetor de células T; TLR: Toll Like Receptors.

4.3. Produção e uso de CAR-Ms

Primeiramente é preciso produzir ou obter macrófagos, atualmente são utilizados MDM ou seja, os monócitos são recolhidos do sangue periférico por aférese, diferenciados em macrófagos e depois associados a CARs (processo com duração de uma semana). Este é um processo caro e relativamente complexo (GABITOVA *et al.*, 2021), por isso, o grupo de ZHANG *et al.* estuda a obtenção de CAR-Ms a partir de iPSCs. As iPSCs são obtidas de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de um dador saudável, os clones de iPSCs são isolados e o CAR pretendido é introduzido por transdução lentiviral. Posteriormente, as iPSCs são induzidas a converterem-se em linhagem mieloide (2020). As células obtidas expressam marcadores específicos de macrófagos e a atividade antitumoral destes CAR-Ms foi comprovada em murinhos NOD Scid Gama, no entanto, a sua eficácia e persistência ainda precisam de ser melhoradas (ZHANG *et al.*, 2020). O grupo de OLIVEIRA *et al.* propôs a utilização de HSPCs, que em contacto com CSF1 ou CSF2, se diferenciam em células mieloides (2013), por sua vez transduzidas com vetores lentivirais contendo CARs específicos. É, no entanto, importante ter em conta que *in vitro* são geradas populações mistas de células mieloides (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Também o grupo de GABITOVA *et al.* estuda uma alternativa, a utilização de monócitos CD14+ diretamente alterados geneticamente para conter CARs, o que reduz a duração do processo a um único dia e demonstra resultados favoráveis, pois os CAR-Ms obtidos revelam boas funções efetoras independentemente da exposição a CSF2, CSF1 ou fatores imunossuppressores. Após obtenção de macrófagos eles são associados a um vetor viral que transporta os genes que codificam o CAR (GABITOVA *et al.*, 2021).

Para a obtenção do vetor é necessário determinar as características do CAR pretendido, selecionar os genes que codificam para estas características e proceder à sua introdução no vetor. Seguidamente, há necessidade de combinar o vetor que codifica o CAR com os macrófagos, *ex-vivo* (GABITOVA *et al.*, 2021) e posteriormente injetar o complexo obtido no doente. Várias estratégias têm sido delineadas para ultrapassar a resistência dos macrófagos à engenharia genética com vetores padrão, as quais analisaremos seguidamente, assim como o processo de produção em profundidade (HEIDT, 2021).

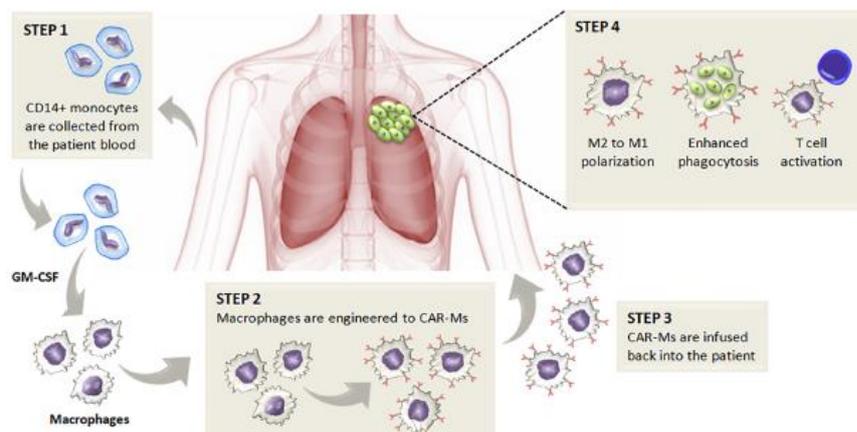


Figura 5: Imagem esquemática do processo de produção e utilização de CAR-Ms (Adaptada de SANTONI *et al.*, 2021).

4.3.1. Plasmídeos/vetores utilizados para introdução de CARs nos macrófagos

Os vetores virais utilizados para construção de CAR-T não são aplicáveis em macrófagos (HEIDT, 2021) devido à expressão de um fator de restrição, SAMHD1, que interfere na transcrição reversa. Foi desenvolvido um sistema lentiviral que induz a degradação de SAMHD1, o que torna possível a utilização de lentivírus como vetores para as células mieloides humanas primárias (VALERI *et al.*, 2021). Apesar desta técnica parecer benéfica, desvantagens foram associadas à utilização de vetores virais, pois sendo os macrófagos células imunes inatas, reconhecem os ácidos nucleicos virais exógenos e geram uma resposta inflamatória ou apoptótica. Posto isto, a *Carisma Therapeutics* investiga um método de entrega do mRNA que não ative este tipo de respostas. Um grupo de investigação utilizou eletroporação para gerar diferentes fragmentos de mRNA, que são sujeitos a modificações de bases e passam a codificar anti-HER2 CARs. Uma desvantagem axial é apresentada pelo mRNA tratado com eletroporação, uma vez que, quando expresso pelos CAR-Ms não origina polarização M1. Para ultrapassar isto, os CAR-Ms não virais foram tratados com IFN β , passando a expressar um fenótipo M1 de forma duradoura e resistente à conversão para M2. O tratamento com IFN β teve também outras consequências interessantes, como o aumento da ação antitumoral dos CAR-Ms e da sua resistência a fatores imunossupressores. Esta técnica permite reduzir os custos, a complexidade de fabrico e a imunogenicidade associada a vetores virais, representando um avanço na produção de CAR-Ms (OHTANI *et al.*, 2020).

No que toca aos vetores utilizados nos ensaios até à data realizados, o grupo de KLICHINSKY *et al.* baseou-se no facto dos macrófagos expressarem CD46, proteína fundamental para o subgrupo B de adenovírus, Ad35, tendo por isso, considerado o Ad5f35 como vetor para entrega dos CARs aos macrófagos (2020). Este grupo introduziu um anti-HER2 CAR num vetor Ad5f35 e foi gerado o Ad5f35-CAR-HER2- ζ . Concluiu-se que esta é

uma ferramenta viável para entrega dos genes que codificam os CARs, já que os macrófagos transduzidos com Ad5f35-CAR-HER2- ζ expressam o CAR com elevada eficiência e reprodutibilidade (KLICHINSKY *et al.*, 2020) e a sua utilização aumenta a probabilidade dos macrófagos manterem um fenótipo M1 (HEIDT, 2021).

O grupo de NIU *et al.* usou o plasmídeo pLenti CMV Puro LUC e o vetor de expressão lentiviral de 3.^a geração que expressa o gene da luciferase e possui um promotor CMV, para a construção de anti-CCR7: CAR-M(TLR2), CAR-M(TLR4), CAR-M(TLR6), CAR-M(MERTK) e CAR-M(4-1BB-CD3 ζ) (2020).

Para produzir o lentivírus, o grupo de MORRISSEY *et al.* utilizou células HEK293T transduzidas com pMD2.G, um vetor lentiviral englobando a construção de interesse e pCMV-dR8.91 (2018).

O grupo de ZHANG *et al.* usou um vetor lentiviral pLenti6/V5-D-TOPO[®] e uma técnica de recombinação homóloga para inserir nele todos os fragmentos do CAR (2019).

Em suma, o vetor utilizado pode ser sujeito a pequenas modificações no sentido de melhorar a atividade dos CAR-Ms, por exemplo, introdução de elementos reguladores ou promotores que permitem a expressão dos CARs apenas em determinados estádios celulares ou na presença de moléculas específicas (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

4.3.2. Transdução e infecção viral dos CAR nos macrófagos

Produzidos os macrófagos, os CARs são geralmente introduzidos por transdução viral (MORRISSEY *et al.*, 2018). A transdução viral pode também ser designada de transfeção e é o processo no qual outras células passam a expressar os genes transportados pelo vírus (CAPSOMIDIS *et al.*, 2018), que na maior parte dos estudos foram lentivírus (MORRISSEY *et al.*, 2018). Nos vários grupos, após transdução, ocorreu seleção do meio lentiviral, filtração e concentração. Posteriormente esse concentrado foi utilizado para infecção (MORRISSEY *et al.*, 2018; NIU *et al.*, 2020) lentiviral, que possibilita expressar de forma estável os CARs nos macrófagos (MORRISSEY *et al.*, 2018).

4.3.3. Infusão e diferenciação dos macrófagos após infecção

Após transdução dos macrófagos com o vetor contendo o CAR, eles passam a expressá-lo e de seguida os CAR-Ms têm de ser introduzidos no indivíduo que pretendemos tratar. De forma geral, os vários grupos estabelecem modelos tumorais animais através da injeção de células cancerígenas, estes animais são depois divididos em grupos e injetados diferenciadamente com os CAR-Ms construídos, CAR-Ms controlo ou um tampão (NIU *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2019).

Dada a plasticidade fenotípica dos macrófagos e o facto da infeção viral ativar o inflamassoma, o grupo de KLICHINSKY *et al.* estudou a hipótese da exposição ao Ad5f35 poder induzir um fenótipo MI, nesse sentido foram analisados transcriptomas de macrófagos de quatro doadores humanos. Observou-se que macrófagos transduzidos com adenovírus, apresentaram um fenótipo MI, independentemente da expressão do CAR. Adicionalmente, a expressão de genes associados a interferões após transdução, as vias celulares ativadas e a indução de componentes chave para a apresentação de antígenos, são também consistentes com a expressão de um fenótipo MI, tendo-se concluído que o fenótipo não é induzido pelo que o CAR expressa, mas sim pelo vetor viral. De notar que, após transdução, o fenótipo MI foi mantido no mínimo 40 dias (2020).

4.3.4. Eficiência e eficácia da transdução de CAR-Ms/avaliação da persistência, biodistribuição e tráfego de CAR-Ms

A eficiência e eficácia da transdução de CAR-Ms refletem-se na persistência e intensidade da sua expressão, na biodistribuição e na movimentação dos CAR-Ms nos tecidos (OHTANI *et al.*, 2020). Em 2017, no encontro anual da AACR (American Association for Cancer Research), o Ad5f35 foi identificado como um vetor eficiente na transdução de macrófagos de doentes com cancro, já que a expressão de CAR-Ms nestes doentes se demonstrou superior a 70% (KLICHINSKY *et al.*, 2017). A expressão de CAR-Ms após transdução foi da mesma forma avaliada pelo grupo de NIU *et al.*, que verificou que 30 a 50% das células eram CAR+ (2020). O grupo de MORRISEY *et al.* examinou também os níveis de expressão dos vários CAR-Ms, tendo os anti-CD19 CAR-M(GFP) revelado expressão mais significativa (2018).

A persistência de CAR-Ms, ou seja, o tempo durante o qual a sua expressão se mantém, foi analisada pelo grupo de KLICHINSKY *et al.*, que concluiu que os CAR-Ms *in vivo* resistem no mínimo 62 dias em murganhos NOD-scid IL2Rgnull-3/GM/SF (NSGS) sem tumor (2020).

Para avaliar a biodistribuição e o movimento dos CAR-Ms em direção ao tumor, foram administrados macrófagos marcados com fluorescência e determinada a sua presença 5 dias depois, em vários órgãos com tumores pré-estabelecidos. Foi detetado tropismo em direção a todos os tipos de tumores sólidos avaliados e provou-se que este movimento não é afetado pela transdução com adenovírus. Para além disso, detetou-se tropismo específico para o fígado, já que em todos os murganhos este foi o primeiro tecido onde se acumularam CAR-Ms após administração intravenosa (IV) (KLICHINSKY *et al.*, 2020).

4.4. Caracterização da atividade dos CAR-Ms

Os CAR-Ms exercem funções dependentes de antígenos (ZHANG *et al.*, 2020) e podem ser ativados por várias moléculas específicas de células tumorais (O'NEILL *et al.*, 2017). Após ativação os CAR-Ms (MORRISSEY *et al.*, 2018) processam os antígenos e apresentam-nos de forma aumentada às células T, ativas e inativas (KLICHINSKY *et al.*, 2020), sendo responsáveis pelo aumento do recrutamento de células T para o ambiente tumoral (KLICHINSKY *et al.*, 2020). Adicionalmente, os CAR-Ms passam a expressar quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, convertem macrófagos M2 em M1 (KLICHINSKY *et al.*, 2020), aumentam a capacidade proliferativa das T CD8+ (KLICHINSKY *et al.*, 2017), podendo estas exercer ação imunitária local durante um longo período de tempo (PRESS RELEASE, CARISMA THERAPEUTICS, 2021). Para além das atividades referidas, os CAR-Ms desencadeiam vias fagocíticas (MORRISSEY *et al.*, 2018), redirecionam macrófagos primários (MORRISSEY *et al.*, 2018), induzem marcadores de maturação e ativação em célula dendrítica (DCs) humanas imaturas (KLICHINSKY *et al.*, 2020) e além disso são resistentes aos efeitos de citocinas imunossupressoras (KLICHINSKY *et al.*, 2020).

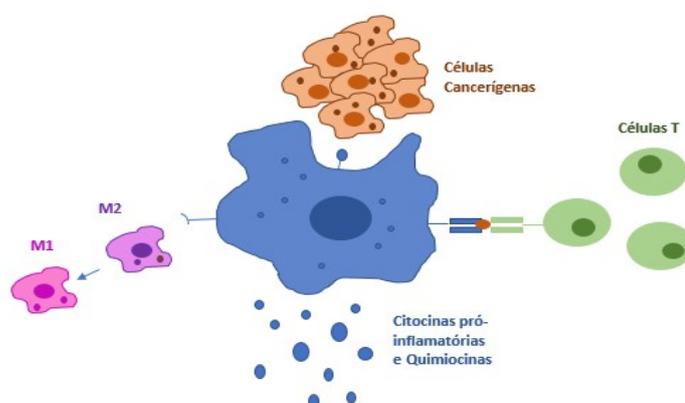


Figura 6: Atividade dos CAR-M (Adaptada de ANDERSON *et al.*, 2020).

4.4.1. Avaliação da capacidade de apresentação cruzada de antígenos dos CAR-Ms

Para além da típica apresentação de antígenos, há literatura que sugere comunicação sistémica cruzada entre o sistema imunitário e o tecido tumoral, ao nível da célula e de fatores solúveis (NIU *et al.*, 2020). Os CAR-Ms demonstram interagir com células do sistema imunitário (KLICHINSKY *et al.*, 2017) e a sua utilização aumenta a apresentação cruzada de antígenos tumorais (MORRISSEY *et al.*, 2018). O grupo de MORRISSEY *et al.* estudou a capacidade dos CAR-Ms estimularem a proliferação de células T, no entanto, não detetou apresentação cruzada robusta (MORRISSEY *et al.*, 2018). Dados de estudos mais recentes confirmam a ocorrência de apresentação cruzada robusta (KLICHINSKY *et al.*, 2020).

No sentido de analisar a capacidade dos CAR-Ms ativarem células T *in vivo*, foram gerados modelos tumorais animais, estes foram posteriormente divididos em 3 grupos e sujeitos a diferentes formas de tratamento: CAR-Ms e células T policlonais derivadas de dadores, apenas CAR-Ms ou células T. Murganhos tratados com CAR-Ms e células T policlonais derivadas de dadores manifestaram respostas antitumorais mais intensas do que os restantes. O efeito sinérgico entre CAR-Ms e células T, deve-se provavelmente à estimulação da atividade antitumoral não específica de células T mediada por CAR-Ms (KLICHINSKY *et al.*, 2020).

O grupo de KLICHINSKY *et al.* avaliou a capacidade de apresentação cruzada dos CAR-Ms e demonstrou que os macrófagos, após fagocitose, são capazes de apresentar antígenos derivados do tumor de forma cruzada, indicando que os CAR-Ms podem levar à disseminação dos epitópos (2020), à redução da probabilidade de escape de antígenos, assim como redução do reaparecimento e proliferação de antígenos tumorais.

O grupo de ZHANG *et al.* avaliou a infiltração de células nos tumores e não observou diferença no número de leucócitos CD45+ infiltrados, DCs, NK ou TAMs. No entanto, os tumores tratados com anti-HER2 CAR-M(CD147) apresentaram conteúdo de células T CD3+ aproximadamente quatro vezes superior aos tratados com macrófagos controlo, tal não se verificou em murganhos deficientes em células T, o que permite concluir que o processo de tratamento é dependente de células T autólogas. Adicionalmente observou-se que os anti-HER2 CAR-M(CD147), graças à apresentação de antígenos às células T, recrutam-nas para o ambiente tumoral, o que é necessário para que ocorra efeito terapêutico (2019).

Estes dados demonstram que os CAR-Ms não se limitam a diminuir a dimensão dos tumores e têm também capacidade de induzir atividade antitumoral de longa data, através da apresentação de antígenos às células T, protegendo os indivíduos de recorrências futuras (KLICHINSKY *et al.*, 2020; MORRISSEY *et al.*, 2018).

4.4.2. Avaliação da atividade fagocítica dos CAR-Ms

O grupo de KLICHINSKY *et al.* estudou a atividade fagocítica em anti-CD19 CAR-M(CD3ζ) que expressam um domínio intracelular intacto e em anti-CD19 CAR-M(CD3Δζ) que expressam um domínio truncado. Os anti-CD19 CAR-M(CD3ζ) desencadearam fagocitose de células tumorais em função de antígenos específicos, mas os anti-CD19 CAR-M(CD3Δζ) e os macrófagos não transduzidos (UTDs) não (2020). Este grupo gerou também CAR-Ms que tinham como alvo a mesotelina ou o HER2, antígenos de tumores sólidos, observou-se fagocitose de células positivas para estes (KLICHINSKY *et al.*, 2020).

O grupo de MORRISEY *et al.* incubou macrófagos anti-CD19 CAR-M(*MEGF10*) com células CD22+ e macrófagos anti-CD22 CAR-M(*MEGF10*) com células CD19+, em nenhum dos estudos ocorreu fagocitose (2018). Deste modo, os dados de ambos os grupos confirmam que os CAR-Ms fagocitam células específicas em função de um antígeno alvo (KLICHINSKY *et al.*, 2020; MORRISSEY *et al.*, 2018). Assim, se os CAR-Ms forem construídos de forma a terem como alvo vários antígenos, eles permitem direcionar macrófagos para diversos antígenos tumorais e desencadear polifagocitose. Para além disto, o grupo de KLICHINSKY *et al.* demonstrou que o domínio intracelular CD3 ζ tem um papel fulcral no direcionamento da atividade fagocítica antitumoral (2020).

Outra característica avaliada foi o potencial fagocítico em função da estrutura dos CAR-M. O grupo de KLICHINSKY *et al.* determinou-o em anti-CD19 CAR(CD3 ζ) e anti-CD19 CAR(Fc γ) (2020). Já os grupos de MORRISEY *et al.* e de NIU *et al.* tiveram em conta os vários tipos de CAR-Ms por eles desenvolvidos. Concluíram que a atividade dos CAR-Ms foi equivalente, independentemente dos domínios utilizados na construção, CD3 ζ ou Fc γ (2018; 2020), no entanto o domínio FcR γ associado a um domínio de recrutamento PI3K, gera um aumento significativo da fagocitose (MORRISSEY *et al.*, 2018). Adicionalmente observaram que a presença de determinados domínios (*MEGF10* e FcR γ) aumenta a fagocitose de partículas CD19+ em comparação com macrófagos vulgares, mas que outros domínios (*BAIL*, *MERTK* e GFP) não têm influência na ligação de partículas CD19+, mesmo estando eles à superfície das células alvo (Morrissey *et al.*, 2018). Relativamente ao anti-CCR7 CAR-M(*MERTK*), estes promoveram fagocitose significativa de células tumorais CCR7+, comparativamente a macrófagos vulgares ou a macrófagos que expressam outros domínios intracelulares, sendo importante notar que todos os CAR-Ms desenvolvidos por este grupo possuem um domínio extracelular constituído por um ligante do CCR7 (CCL19) (NIU *et al.*, 2020).

O terceiro ponto analisado foi a capacidade dos CAR-Ms fagocitarem alvos de diferentes tamanhos. O grupo de MORRISEY *et al.* concluiu que anti-CD19 CAR-M(*MEGF10*) fagocitam especificamente partículas com diâmetros entre 2.5 μ m e 20 μ m e são eficientes comparativamente ao sistema fagocítico endógeno (2018), demonstrando um aumento da especificidade fagocítica em função do aumento do diâmetro (MORRISSEY *et al.*, 2018).

Avaliou-se também a influência do bloqueio CD47/SIRP α na atividade fagocítica dos CAR-Ms, sendo o eixo CD47/SIRP α antifagocítico e um dos principais mecanismos

responsáveis por regular a fagocitose, constatou-se que o seu bloqueio a aumenta (KLICHINSKY *et al.*, 2017).

Para além dos estudos efetuados, o grupo de MORRISEY *et al.* procurou direcionar a fagocitose para um alvo específico. Colocou anti-CD19 CAR-M(MEGF10) e anti-CD19 CAR-M(FcR γ) em co-cultura com células Raji B, células cancerígenas que expressam elevados níveis de CD19. A maior parte dos CAR-M (85% dos anti-CD19 CAR-M(FcR γ) e 78% dos anti-CD19 CAR-M(MEGF10)) fagocitaram partes da célula alvo. A remoção do domínio de sinalização (anti-CD19 CAR-M(GFP)) reduziu a trogocitose, isto é a transferência intercelular de fragmentos de membrana e moléculas associadas, durante o contacto intercelular, o que revela dependência deste domínio. Anti-CD19 CAR-M(MEGF10) foram capazes de desencadear trogocitose por fibroblastos humanos NIH 3T3, fagócitos não profissionais, o que alerta para a possibilidade dos CAR-Ms poderem promover fagocitose dependente de antígenos tumorais, pelos dois tipos de fagócitos (profissionais e não profissionais) (2018).

O grupo de MORRISEY *et al.* observou também que células Raji B inteiras podem ser fagocitadas por anti-CD19 CAR-M(MEGF10) e anti-CD19 CAR-M(FcR γ), no entanto de forma esporádica, o que sugere que as interações dos macrófagos com o alvo são provavelmente parcas para desencadear este tipo de fagocitose (2018). Então, este grupo combinou vários motivos de sinalização para desenvolver um recetor (MORRISSEY *et al.*, 2018). Através da fusão de uma porção do domínio CD19 citoplasmático ao anti-CD19 CAR-M(FcR γ), surgiu o anti-CD19 CAR-M(tandem), este CAR-M possui uma capacidade de fagocitose de células inteiras três vezes superior aos anti-CD19 CAR-M(GFP), o que se justifica pela combinação dos vários motivos destinados a recrutar diferentes fagócitos. Outra forma de aumentar a eficiência dos CAR-Ms pode ser através da manipulação das propriedades físicas do alvo de fagocitose, visto que o aumento da rigidez do alvo promove o aumento da fagocitose (MORRISSEY *et al.*, 2018). Seguidamente, o grupo de MORRISEY *et al.* incubou CAR-Ms com células Raji B, para determinar se a combinação de trogocitose e fagocitose de células inteiras é suficiente para que ocorra redução significativa de células cancerígenas. Os resultados foram favoráveis, no entanto, o ensaio não permitiu distinguir a redução de células cancerígenas obtida através da trogocitose, da conseguida a partir de fagocitose de células inteiras, podendo ambas contribuir para as taxas de redução de Raji B. Em suma, estes dados advertem para o facto de os CAR-Ms serem uma boa estratégia para direcionar os macrófagos para os tumores, podendo iniciar fagocitose de células inteiras e trogocitose, com consequente eliminação de células cancerígenas (2018).

Posto isto, a medida em que ocorre morte tumoral e fagocitose está diretamente relacionada com os níveis de expressão de antígenos alvo e de CAR-Ms (KLICHINSKY *et al.*, 2020).

4.4.3. Avaliação da atividade antitumoral dos CAR-Ms

O grupo de NIU *et al.* efetuou vários estudos para avaliar a atividade antitumoral. *In vivo*, o efeito antitumoral dos anti-CCR7 CAR-M(MERTK) foi avaliado num modelo de cancro da mama 4T1 subcutâneo (SC), em que células 4T1-Luc foram implantadas em murganhos BALB/c. No primeiro estudo, 4 dias após implantação de células tumorais, os murganhos foram injetados com 5×10^8 células/kg de anti-CCR7 CAR-M(PCDH) (macrófagos controlo), anti-CCR7 CAR-M(MERTK) ou solução tampão fisiológica (phosphate-buffered saline, PBS), o que se repetiu de 5 em 5 dias, 5 vezes por dia. No 31.º dia, os murganhos que tinham sido inoculados com anti-CCR7 CAR-M(MERTK) demonstraram aumento do tempo médio de sobrevivência, diminuição do volume tumoral e elevado número de células tumorais apoptóticas em comparação com os murganhos tratados com macrófagos controlo. Adicionalmente, *in vitro* foi demonstrado que anti-CCR7 CAR-M(MERTK) inibiram a disseminação sistémica das células tumorais. A conclusão obtida foi que anti-CCR7 CAR-M apresentam ação antitumoral, em modelos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*.

No segundo estudo, 4 dias após implantação de células tumorais, os murganhos foram tratados com 5×10^8 células/kg de anti-CCR7 CAR-M(MERTK) ou anti-CCR7 CAR-M(PCDH) por via IV de 5 em 5 dias, 3 vezes por dia. No 21º dia, os anti-CCR7 CAR-M(MERTK) demonstraram suprimir o crescimento tumoral, contudo não foi observada infiltração de CAR-Ms nos tecidos tumorais, a não ser no baço e timo, nos restantes tecidos ocorreu infiltração de células T CD3+, o que pode significar que estas células imunitárias foram as responsáveis pelos efeitos antitumorais. É de acrescentar que murganhos tratados com anti-CCR7 CAR-M(MERTK) apresentaram redução do número de células CCR7+ no tumor, timo, baço e bigodes. Foi também detetado aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos tumorais, indicando surgimento de um ambiente inflamatório benéfico, aumento que não se verificou no ensaio *in vitro* de citotoxicidade. As evidências apresentadas apoiam a hipótese de anti-CCR7 CAR-M(MERTK) suprimirem a progressão tumoral, por reforçarem a resposta imune sistémica (2020), estes CAR-Ms demonstraram capacidade de matar células tumorais 3 vezes superior relativamente a anti-CCR7 CAR-M(PCDH) (controlo) (NIU *et al.*, 2020).

O grupo de ZHANG *et al.* investigou os efeitos de anti-HER2 CAR-M(CD147) no crescimento de células tumorais *in vitro*, realizou co-culturas com macrófagos controlo ou

com anti-HER2 CAR-M(CD147), não observou diferenças na capacidade de proliferação das células HER2-4T1, na apoptose das células tumorais, no seu ciclo celular, ou, na sua capacidade de invasão. Isto significa que os anti-HER2 CAR-Ms(CD147) não inibiram o crescimento de células tumorais *in vitro* quando comparados com macrófagos controlo. Para determinar o efeito de anti-HER2 CAR-M(CD147) em tumores sólidos *in vivo*, estabeleceu um modelo de cancro da mama em modelos animais, posteriormente injetados por via IV com macrófagos controlo ou anti-HER2 CAR-M(CD147). O volume tumoral foi determinado e conclui-se que os anti-HER2 CAR-M(CD147) reduziram o crescimento de peso do baço e inibiram o crescimento tumoral em comparação com os macrófagos controlo (2019).

O grupo de KLICHINSKY *et al.* estudou *in vivo* a atividade antitumoral dos CAR-Ms, em dois modelos de murganhos NSGS. No 1º modelo foram injetadas células SKOV3 por via IV, dando origem a metástases pulmonares. Seguidamente, os murganhos NSGS foram sujeitos a uma única injeção IV de soro fisiológico, macrófagos transduzidos com vetor Ad5f35 vazio, anti-HER2 CAR-M(CD3ζ) ou macrófagos UTD. Conclui-se que uma única infusão de CAR-Ms levou ao prolongamento da sobrevivência global e à redução da carga tumoral metastática. Num 2.º modelo, células SKOV3 foram injetadas por via intraperitoneal originando carcinomatoses. Posteriormente, procedeu-se a uma única injeção intraperitoneal de soro fisiológico, anti-HER2 CAR-M(CD3ζ) ou macrófagos UTD. Observou-se que o tratamento com CAR-Ms levou a melhoria significativa da sobrevivência global e regressão tumoral acentuada na maioria dos murganhos (2020). O grupo de KLICHINSKY *et al.* concluiu que CAR-Ms gerados com Ad5f35 parecem eliminar células tumorais mais eficazmente do que macrófagos controlo *in vitro* e *in vivo*, e que uma única infusão de CAR-Ms humanos diminuiu a carga tumoral e prolongou a sobrevivência global (2020).

Num ensaio, *in vitro* em que se analisou a morte celular com base na atividade da luciferase, anti-HER2 CAR-M demonstraram capacidade para matar células SKOV3 seis vezes superior ao trastuzumab (KLICHINSKY *et al.*, 2017).

O grupo de PIERINI *et al.* estudou pela primeira vez o comportamento de CAR-M num ambiente imunocompetente *in vivo*. Administrou tumores CT26-HER2+(SC) em murganhos BALB/c, tratou-os com UTD ou anti-HER2 CAR-M. Murganhos tratados com CAR-Ms demonstraram maior sobrevivência, controlo tumoral e dissiminação de epitopos, nalguns houve sinais de indução de memória prolongada relativa aos antígenos associados ao tumor (TAA). Para avaliar a resposta imune sistémica antitumoral, o grupo sujeitou os murganhos BALB/c à introdução de tumores CT26-Wt e CT26-HER2+, em dois flancos opostos, tratou os tumores HER+ localmente com anti-HER2 CAR-M. Os tumores CT26-

HER2+ desapareceram em 75% dos animais e o crescimento de CT26-Wt demonstrou-se significativamente diminuído, o que denota a ocorrência de efeito abascopal (2021).

O grupo de OLIVEIRA *et al.* comparou a capacidade apoptótica de células miéloides e NK transformadas com CARs, as primeiras demonstraram maior taxa de apoptose de células Raji B (2013).

De forma geral, os vários grupos concluíram que animais tratados com CAR-M demonstraram diminuição da carga tumoral, comparativamente ao controlo (KLICHINSKY *et al.*, 2020; NIU *et al.*, 2020).

4.4.4. Efeito dos CAR-Ms no TME

O grupo de KLICHINSKY *et al.* avaliou a interação bidirecional entre os CAR-Ms e o TME em murganhos NSG com sistemas imunitários humanizados (HIS) gerados por transplantação de células estaminais hematopoiéticas (HSCs) CD34+ humanas. Após deteção de células mieloides humanas no sangue periférico, foram inseridos sub-cutaneamente tumores ováricos SKOV3, dias depois CAR-Ms ou UTD humanos masculinos foram injetados intratumoralmente. A utilização de CAR-Ms ou UTD masculinos e HSCs permite distinguir no TME os macrófagos inseridos adaptativamente, dos macrófagos derivados de HSCs. Os macrófagos são caracterizados pela expressão de marcadores, mas neste estudo apenas os CAR-Ms expressaram genes associados à expressão M1, o que demonstra que os CAR-Ms mantêm um fenótipo M1 no TME humano (2020).

O grupo de KLICHINSKY *et al.* estudou também o efeito dos CAR-Ms no TME circundante, utilizando um modelo animal com TME humanizado. O TME foi agrupado em dois *clusters* (0 e 1), o 1 enriquecido com UTD (71% UTD, 29% CAR) e o 0 com CAR-M (86% CAR, 14% UTD). Ao analisar os *clusters*, inferiu-se que o 0 expressava essencialmente genes pró-inflamatórios, o que comprova que os CAR-Ms *in vivo* remodelam o TME para um fenótipo M1. Para validar estes resultados, foi realizado um estudo idêntico *in vitro*, no qual se avaliou o efeito dos CAR-Ms em macrófagos M2. Foi corroborado que os CAR-Ms induzem vias e marcadores pró-inflamatórios em macrófagos M2, ativam e induzem maturação de marcadores pró-inflamatórios em DCs imaturas, assim como o recrutamento de células T ativas e inativas, mantendo a sua atividade antitumoral mesmo na presença de macrófagos humanos M2 e exercendo efeito dominante nas células imunes vizinhas (2020).

O grupo de ZHANG *et al.* analisou em que medida o anti-HER2 CAR-M(CD147) pode alterar a sinalização interna e afetar o sinal subsequentemente expresso, após detetar o HER2. Macrófagos controlo e anti-HER2 CAR-M(CD147) foram colocados em co-cultura com células HER2-4T1. Posteriormente, os macrófagos foram recolhidos para análise da

expressão de MMPs. As observações realizadas sugerem que o aumento da expressão de MMPs nos CAR-M(CD147) está relacionado com a estimulação dos antígenos tumorais. Por outro lado, em anti-HER2 CAR-M(CD147) colocados em co-cultura com *wild-type* (WT) 4T1, os níveis de expressão de MMPs foram idênticos aos expressos pelos macrófagos controle, o que demonstra que anti-HER2 CAR-M(CD147) ativam a expressão de MMPs em macrófagos e reconhecem especificamente o antígeno HER2 (2019).

O grupo de PIERINI *et al.* estabeleceu um *immunocompetent syngeneic mouse model* para avaliar a interação dos CAR-M com o sistema imune adaptativo e com o TME. Inicialmente, macrófagos derivados da medula óssea de murinos, foram transduzidos com um vetor Ad5f35, para expressar anti-HER2 CAR-M. Estes CAR-Ms induziram a expressão de MHCI e MHCII nas células tumorais e efetuaram apresentação cruzada de antígenos do tumor, o que resultou na ativação de células T CD8+ e fagocitose específica de células HER2+, de forma dependente da dose. Assim sendo, a conclusão retirada foi que os CAR-Ms têm capacidade de reprogramar o TME e induzir uma resposta imune sistêmica face a tumores sólidos (2021).

4.4.5. Efeito dos CAR-Ms nos TAMs

Existe interesse crescente em gerar efeito pró-inflamatório antitumoral através da diminuição do número de TAMs ou da sua repolarização para M1. Assim, o grupo de KLICHINSKY *et al.* lançou a hipótese de monócitos humanos do sangue periférico serem diferenciados em macrófagos, dotados de domínios específicos de antígenos tumorais e com a capacidade de se dirigirem para os tumores. Nesse sentido, desenvolveu um método de transferência de genes que conferiu aos macrófagos geneticamente modificados características pró-inflamatórias, assim como potencial de polarizar mais intensamente o microambiente circundante. Para além da atividade antitumoral direta dos CAR-Ms, detetaram capacidade de co-estimulação de células T e apresentação cruzada de antígenos às mesmas, aumentando a possibilidade dos CAR-Ms alterarem as características do TME, diminuírem a carga tumoral e assim gerarem uma resposta imunológica (2020).

Perante o facto de os tumores sólidos serem ricos em TAMs, o grupo de KLICHINSKY *et al.* avaliou a sua interação bidirecional com CAR-Ms. Os TAMs não conseguiram converter CAR-M de M1 para M2, mas os CAR-Ms converteram TAM para M1. A presença de M2 não teve impacto na capacidade de morte tumoral dos CAR-Ms, destacando a sua resistência aos componentes imunossupressores do TME (2020).

4.4.6. Validação da plasticidade fenotípica dos CAR-Ms

Para avaliar a plasticidade fenotípica, o grupo de KLICHINSKY *et al.* estimulou *in vitro*, macrófagos humanos transduzidos com Ad5f35 ou macrófagos controlo (UTD), com fatores indutores M2 ou com meios contendo SKOV3. Após estimulação, apenas os macrófagos UTD expressaram de forma avultada o marcador M2 (CD206) e aumentaram o consumo basal de oxigénio, situação expectável em todos os macrófagos M2 estimulados com IL4, tendo-se concluído que em UTD a fração de genes induzidos foi muito superior do que em CAR-Ms, o que significa que a transdução com Ad5f35 influencia a plasticidade fenotípica, diminuindo-a (2020).

Para avaliar o efeito dos anti-HER2 CAR-M(CD147) no fenótipo dos macrófagos, o grupo de ZHANG *et al.* analisou a expressão das moléculas membranares em macrófagos após co-cultura com anti-HER2 CAR-M(CD147). A fagocitose, produção de ROS, secreção de citocinas inflamatórias e expressão das moléculas da superfície membranares, não sofreram alteração, o que indica que anti-HER2 CAR-M(CD147) ativam especificamente a expressão MMPs sem afetar outras funções (2019). (Anexos: Tabela II)

4.4.7. Citotoxicidade tumoral e não tumoral

Os CAR-Ms apresentam atividade direcionada a antigénios, cuja presença em células não tumorais, pode trazer efeitos nefastos consequentes ao uso de CAR-Ms. Por outro lado, a intensidade da toxicidade em células tumorais tem consequências diretas no sucesso da terapêutica. Posto isto, previamente à utilização clínica é importante avaliar detalhadamente a citotoxicidade (KLICHINSKY *et al.*, 2020).

Até hoje, vários ensaios foram realizados. O grupo de KLICHINSKY *et al.* efetuou um ensaio *in vitro*, utilizando amostras de tecido humano não tumoral, no qual determinou que células normais não sofrem fagocitose por CAR-Ms (2020). O grupo de NIU *et al.* realizou um ensaio do mesmo tipo, no qual células 4T1-Luc-CCR7 foram colocadas em co-cultura com CAR-Ms. As conclusões retiradas foram que a toxicidade das células efectoras é influenciada pela atividade luciferase das mesmas, sendo que quanto menor esta atividade, maior a capacidade dos CAR-Ms para combater alvos tumorais (2020).

Tendo em conta a relevância deste ponto, foram também efetuados estudos *in vivo*, em murganhos BALB/c, nos quais se estudaram os efeitos da infusão (IV) de altas doses de anti-CCR7 CAR-M(MERTK) e a manifestação de citotoxicidade dependente da dose. Para isso, administraram 5×10^8 anti-CCR7 CAR-M (MERTK)/kg ou anti-CCR7 CAR-M(PCDH) (células controlo) e verificaram alopecia temporária. Com a mesma dose, mas administrada a cada 2 dias, 5 vezes por dia, notaram diminuição significativa da temperatura e peso

corporal, 11 dias mais tarde analisaram órgãos de murganho e detetaram toxicidade intestinal. Mantendo a dose, mas com administração a cada 5 dias, 5 vezes por dia, observaram ligeira alopecia, sem alteração da temperatura e peso corporal, nem deteção de toxicidade intestinal. Estes resultados confirmaram que os anti-CCR7 CAR-M(MERTK) apresentam toxicidade dependente da dose, *in vivo*, específica para células CCR7+. Foi observado que o CCR7 é expresso tanto nas vilosidades intestinais como nos folículos pilosos, o que justifica a ocorrência de toxicidade intestinal e cutânea. Assim sendo, concluiu-se que a toxicidade fora do alvo deve-se geralmente à presença de antígenos alvo em tecidos normais (NIU *et al.*, 2020).

O grupo de ZHANG *et al.* para analisar se a reinfusão de anti-HER2 CAR-M(CD147) causa CRS, determinou os níveis das citocinas em amostras de soro e homogeneizados tumorais. Os níveis de citocinas inflamatórias foram inferiores em murganhos tratados com anti-HER2 CAR-M(CD147) comparativamente com murganhos tratados com macrófagos controlo, já os níveis de IL12 e IFN γ que podem ser responsáveis por potentes respostas antitumorais, foram superiores nos tecidos tumorais de murganhos tratados com anti-HER2 CAR-M(CD147). Concluíram então que os efeitos de anti-HER2 CAR-M (CD147) são locais e específicos do tumor, podendo não causar CRS (2019).

4.5. CAR-Ms e o sistema imune adaptativo, combinações racionais com IIC

Atualmente é estudada a combinação de CAR-Ms com IIC, no sentido de aumentar a eficácia e prevalência dos primeiros (HEIDT, 2021). Um dos requisitos para a susceptibilidade a terapias com IIC é a infiltração de células T no tumor (ZHANG *et al.*, 2019), os anti-HER2 CAR-M(CD147) desenvolvidos pelo grupo de ZHANG *et al.* demonstraram aumentar esta infiltração, contribuindo para diminuir a resistência dos tumores às terapias em questão (2019).

Dado o efeito dos CAR-Ms no sistema imune adaptativo, o grupo de PIERINI *et al.* decidiu avaliar a combinação de CAR-Ms com inibidores do *checkpoint* PD1, num modelo tumoral CT26-HER2 resistente a terapia com anti-PD1. Os resultados obtidos demonstraram que a combinação melhora a sobrevivência global e o controlo tumoral de doentes com tumores sólidos resistentes (2021).

4.6. Ensaios clínicos com CAR-Ms

No dia 18 de março de 2021, a *Carisma Therapeutics* anunciou que tinha administrado a primeira dose de anti-HER2 CAR-M num doente, administração que se realizou no

contexto de um ensaio clínico multicêntrico, atualmente em Fase I (KLICHINSKY *et al.*, 2020). Trata-se do primeiro ensaio clínico que estuda a aplicação de CAR-Ms como terapêutica e está a ser realizado em doentes com tumores sólidos recorrentes ou metastáticos que sobreexpressam HER2, cujos tumores não respondem às terapêuticas existentes ou não têm terapêuticas aprovadas para este alvo (KLICHINSKY *et al.*, 2020). Primeiramente, são colhidos monócitos do sangue periférico por aférese (BAUML *et al.*, 2021), estes são estimulados a diferenciarem-se em macrófagos autólogos (KLICHINSKY *et al.*, 2020), que por sua vez, são transduzidos com adenovírus, que transportam o anti-HER2 CAR (KLICHINSKY *et al.*, 2020), dando origem aos CAR-Ms. Os CAR-Ms produzidos são criopreservados para posterior utilização (BAUML *et al.*, 2021). O ensaio integra até ao momento 18 doentes, que foram divididos em dois grupos, sendo que ambos vão receber iguais quantidades de CAR-Ms. O grupo I vai ser submetido a uma injeção IV, cuja dose é aumentada ao longo do tempo. O grupo II receberá no primeiro dia a dose total (IV). Os objetivos desta fase do ensaio são estudar a segurança e tolerância da terapêutica, através da determinação da severidade e frequência de efeitos adversos nos doentes em estudo, assim como a sua viabilidade. Para além disso, pretendem determinar a *objective response rate* (ORR), isto é, a proporção de sujeitos que atinge uma resposta objetiva, quer total, quer parcial. Esta avaliação será feita utilizando o RECIST v1.1., tal como a determinação da *progression-free survival* (PFS), ou seja, o tempo decorrido entre a administração da primeira dose e o momento em que é documentada morte ou a primeira progressão na doença (KLICHINSKY *et al.*, 2020).

Uma nota importante a ter em conta é que os CAR-Ms utilizados no ensaio possuem um fenótipo especificamente antitumoral (CARISMA, 2021).

4.7. Aplicações Terapêuticas dos CAR-Ms

A expressão de CARs pelos macrófagos permite-lhes fagocitar alvos de diferentes tamanhos e com diversas características, o que torna os CAR-Ms úteis em várias frentes terapêuticas (MORRISSEY *et al.*, 2018), nomeadamente, doenças infecciosas, doenças auto-imunes e cancro (O'NEILL *et al.*, 2017). Atualmente a *Carisma Therapeutics* desenvolve esforços no sentido de obter macrófagos alogénicos para produzir CAR-Ms, tornando-os uma solução terapêutica para uma mais vasta população de doentes (CARISMA, 2021).

4.7.1. Terapia em tumores mamários com CAR-Ms

A ECM tumoral é responsável por diminuir o efeito de fármacos anticancerígenos, para evitar isto, foram criados CAR-Ms específicos. Estes CAR-Ms são ativados após

reconhecimento do antígeno HER2 do tumor, desencadeando sinalização CD147 e aumentada expressão das MMPs, que contribui para degradar a ECM tumoral e facilitar a entrada de células T no tumor (ZHANG *et al.*, 2019). O HER2 é um recetor tirosina cinase transmembranar que promove várias funções celulares. A amplificação HER2 é identificada em aproximadamente 30% dos cancros mamários humanos e pode desencadear ativação de vias de proliferação e antiapoptóticas (MILLING *et al.*, 2017).

O modelo de tumor mamário 4T1-HER2 de murino apresenta semelhanças com a patologia em humanos, tendo sido, por isso, usado para estudar a efetividade dos anti-HER2 CAR-M(CD147) *in vivo*. Para avaliar o efeito dos anti-HER2 CAR-M(CD147) na ECM, foi analisado o conteúdo em colagénio dos tecidos tumorais, que se revelou significativamente reduzido após a infusão de macrófagos, enquanto a expressão das MMPs 3, 14 e 15 se apresentou aumentada. Tais observações confirmam a degradação da ECM pelos anti-HER2 CAR-M(CD147), no entanto este efeito pode ter consequências nefastas, já que a degradação da ECM facilita a invasão de células tumorais e metastização (ZHANG *et al.*, 2019), no entanto o grupo de ZHANG *et al.* demonstrou que quando o crescimento tumoral é inibido, não há metastização. Em suma, a infusão de anti-HER2 CAR-M(CD147) pode degradar a densa ECM tumoral, ou seja, exercer acção antitumoral, processo que envolve as MMPs 3, 14 e 15 (2019).

O grupo de ZHANG *et al.* construiu também um CAR contendo um domínio de sinalização intracelular da molécula CD147 humana (CAR-h147), com o objetivo de definir se esta estratégia de tratamento funciona com macrófagos humanos (Zhang *et al.*, 2019). Os estudos foram realizados em modelos tridimensionais (3D), pois culturas bidimensionais (2D) não podem ser utilizadas para estudos de infiltração celular, tendo-se concluído que os anti-HER2 CAR-M(CDh147) facilitam a infiltração de células T, inibindo o crescimento tumoral, em modelos 3D multicelulares de cancro da mama humano (2019). Posto isto, futuramente os anti-HER2 CAR-M(CD147) poderão vir a ser usados como terapêutica de cancros de mama HER2+.

4.7.2. Terapia noutros tumores com CAR-Ms

Apesar do HER2 ser especialmente conhecido pela presença em tumores mamários, existe numa vasta gama de tumores, nomeadamente do trato gastrointestinal, podendo os CAR-Ms direcionados para HER2 serem usados no tratamento dos mesmos. Atualmente, está a decorrer um ensaio clínico com CAR-Ms, onde um critério de inclusão é a existência de tumores HER2+ sólidos metastáticos ou resistentes, tendo sido definida uma lista de patologias elegíveis para participação no ensaio. Estas patologias são um conjunto de

adenocarcinoma, cancros, carcinomas e neoplasias, todos eles HER2+ (KLICHINSKY *et al.*, 2020).

Tabela 5: Patologias elegíveis para a aplicação de CAR-M.

Patologia/Condição	Referência
Adenocarcinoma	(KLICHINSKY <i>et al.</i> , 2020)
Cancro	
<ul style="list-style-type: none"> • ductos biliares, • pancreático, • trato biliar, • bexiga, 	
<ul style="list-style-type: none"> • mama, • mama inflamatório, • coloretal. 	
Carcinoma	
<ul style="list-style-type: none"> • ductal, • hepatocelular, • não pequenas células do pulmão, • pequenas células do pulmão, 	
<ul style="list-style-type: none"> • do epitélio do ovário, • de células escamosas, • de células de transição. 	
Neoplasia	
<ul style="list-style-type: none"> • das junções esofagogástricas, • gástrica, • do ovário. 	

4.8. Vantagens e Desvantagens dos CAR-Ms

Tendo em conta os dados apresentados, a utilização de CAR-Ms demonstrou apresentar vantagens significativas, conseqüentes às características ímpares dos macrófagos. Uma vez que os monócitos e macrófagos são ativamente recrutados para tumores sólidos, é possível aplicar esta terapêutica no seu tratamento (CARISMA, 2021). Dado o inferior tempo de vida médio dos macrófagos relativamente às células T, o risco de CRS é diminuído, mesmo que os macrófagos persistam no local da infeção durante semanas, não possuem capacidade de memória, o que permite evitar danos desnecessários nas células normais, pois os CAR-Ms reconhecem antigénios específicos do tumor, que não se expressam ou estão fracamente expressos no tecido normal (O'NEILL *et al.*, 2017). Também a capacidade dos CAR-Ms sofrerem polarização para um fenótipo M1, após o reconhecimento antigénico, é um fator relevante, pois permite uma resposta antitumoral mais intensa, já que os CAR-Ms passam a ter capacidade de aumentar a expressão de genes, que aumentam a ativação ou recrutamento de células imunes, como as células T (CARISMA, 2021), resultando numa geração contínua de células efetoras (OLIVEIRA *et al.*, 2013), que combatem a forte imunossupressão exercida pelo tumor (CARISMA, 2021). Adicionalmente, sendo os macrófagos APCs profissionais capazes de levar à ativação do sistema imune adaptativo do doente, com a utilização de CAR-Ms é possível ultrapassar as desvantagens das terapias que

se direcionam apenas para um antígeno, que acabam por não ser totalmente eficazes em ambientes de heterogeneidade antigénica, como é o caso do ambiente tumoral (CARISMA, 2021). De notar, que a utilização de macrófagos por si só não tem estes efeitos, sendo eles conseguidos graças à associação dos CARs, responsáveis por reter e incitar a ação antitumoral dos macrófagos, imunossuprimida nos TAM (CARISMA, 2021).

Esta terapêutica apresenta, mesmo assim, algumas desvantagens, como a CRS que apesar de ser um efeito secundário largamente associado a tratamentos com CAR-T, foi atribuída a macrófagos em vários estudos (ZHANG *et al.*, 2019). Por outro lado, o número de CAR-Ms que podem ser injetados nos doentes é limitado, o que, associado ao facto dos macrófagos não proliferarem após injeção *in vitro* nem *in vivo* (CHEN *et al.*, 2021) pode fazer com que o número de células efetoras no doente seja insuficiente. Em contrapartida, mesmo que o número de CAR-Ms no doente seja elevado, *in vivo*, estes apresentam tendência de acumulação no fígado (KLICHINSKY *et al.*, 2020), o que pode dificultar a ação dos CAR-Ms sobre os tecidos tumorais. Caso os CAR-M atinjam o tumor, a elevada heterogeneidade das células tumorais pode fazer com que a expressão de antígenos alvo não seja suficiente (CHEN *et al.*, 2021). Assim, todos os pontos previamente referidos podem pôr em causa a efetividade da terapêutica. Outro ponto negativo é a complexidade associada à conceção de CAR-Ms, que não pode ser feita de forma generalista, dado que os efeitos de diferentes MMPs devem ser tidos em conta quando se concebem CAR-Ms para diferentes tipos de tumores (ZHANG *et al.*, 2019). Adicionalmente, o grupo de OLIVEIRA *et al.* determinou que a lise efetuada pelos CAR-mieloides apresentam menor especificidade antigénica, comparativamente a CAR-T e CAR-NK (2013).

5. Conclusão

As terapêuticas que modulam o sistema imunitário são, por vezes, encaradas como uma “espada de dois gumes”, uma vez que ao ativarem o sistema imunitário podem gerar efeitos secundários auto-ímmunes e inflamações sistémicas inespecíficas, mas ao mesmo tempo, esta ativação é necessária para um efeito antitumoral potente (MILLING *et al.*, 2017). Apesar disso, a imunoterapia é encarada como futuro do tratamento do cancro. A alteração genética de macrófagos para passarem a expressar CARs parece à partida benéfica, dado as funções efetoras únicas dos macrófagos e a sua capacidade de penetração nos tumores, nomeadamente sólidos. No entanto, previamente à sua utilização clínica, diversos estudos devem ser efetuados. Vários estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* estão em desenvolvimento e um ensaio clínico teve início em 2020, do qual ainda não foram apresentados quaisquer resultados.

Dados de ensaios pré-clínicos demonstram que os CAR-Ms conseguem aceder aos tumores sólidos, ambiente hostil onde conseguem sobreviver, fagocitar células que expressam antígenos específicos (PRESS RELEASE, CARISMA THERAPEUTICS, 2021) e desencadear apresentação cruzada de antígenos e co-estimulação de células T (KLICHINSKY *et al.*, 2020). Para além disso, exercem atividade antitumoral direta, o que aumenta a possibilidade dos CAR-Ms diminuírem a carga tumoral e alterarem o TME, levando à propagação de epitopos (KLICHINSKY *et al.*, 2020) e ao desenvolvimento de memória imunológica (PRESS RELEASE, CARISMA THERAPEUTICS, 2021). Assim, os resultados até ao momento apresentados demonstram que os CAR-Ms são capazes de ultrapassar alguns dos principais desafios encontrados com outras terapias celulares, representando os CAR-Ms um novo tipo de imunoterapia que pode ser direcionada a diversos antígenos tumorais. No entanto, futuramente devem ser feitos esforços no sentido de maximizar a eficácia e segurança dos CAR-Ms.

Para além disto, dada a interação direta entre os CAR-Ms e o sistema imune adaptativo, combinações racionais com IIC estão a ser profundamente investigadas e podem resultar num efeito sinérgico antitumoral. Outra opção é a engenharia genética, que tem vindo a ser utilizada para aumentar a expressão de citocinas anti-tumorais ou co-estimuladoras pelos CAR-M (CHEN *et al.*, 2021), com o objetivo de melhorar a capacidade de apresentação de antígenos. Ademais, o aumento da expressão de moléculas de migração está a ser analisado, por aumentar a dispersão dos CAR-Ms no tecido tumoral. O acréscimo da persistência é outro alvo de estudo, que pode ser conseguido com uma maior expressão de moléculas anti-apoptóticas (CHEN *et al.*, 2021), além disso em tumores sólidos muito resistentes, pode considerar-se combinar CAR-M com CAR-T (CHEN *et al.*, 2021).

Um fator crítico de sucesso para a aplicação desta terapia na clínica é o desenvolvimento de um processo de produção rentável e com uma boa transposição de escala, assim como a obtenção de CAR-Ms alogénicos.

6. Bibliografia

1. ABUJAROUR R., FONG L., CUGOLA F., BROOKHOUSER N., RULLER C., MANDEFRO B., HUFFMAN J., FARHAT K., LEE T., VALAMEHR B., - **Sequential CRISPR-Mediated Engineering and Clonal Banking for the Generation of Multiplexed Engineered Master Pluripotent Cell Lines for the Mass Manufacture of Offthe- Shelf Immune Cells Targeting Solid Cancers.** *Molecular Therapy*, 29:4S1 (2021) 3–4.
2. ADAMS D., MARTIN S., ALPAUGH K., CHARPENTIER M., TSAI S., BERGAN R., OGDEN I., CATALONA W., CHUMSRI, S., TANG C., CRISTOFANILLI M., - **Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111:9 (2014) 3514–3519.
3. ANDERSON N., MINUTOLO N., GILL S., KLICHINSKY M., - **Macrophage-based approaches for cancer immunotherapy.** *Cancer Research*, 81:5 (2020).
4. BAUML J., BARTON D., RONCZKA A., CUSHING D., KLICHINSKY M., DEES E., - **A Phase I, First in Human (FIH) Study of Adenovirally Transduced Autologous Macrophages Engineered to Contain an Anti-HER2 Chimeric Antigen Receptor (CAR) in Subjects with HER2 Overexpressing Solid Tumors.** *Journal of Clinical Oncology*, 39:15 (2021) TPS2660-TPS2660.
5. BAZZI S., EL-DARZI E., MCDOWELL T., MODJTAHEDI H., MUDAN S., ACHKAR M., AKLE C., KADARA H., BAHR G., - **Defining genome-wide expression and phenotypic contextual cues in macrophages generated by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, macrophage colony-stimulating factor, and heat-killed mycobacteria.** *Frontiers in Immunology*, 8:October (2017).
6. BENNOUNA J., BOMPAS E., NEIDHARDT E., ROLLAND F., PHILIP I., GALÉA C., SALOT S., SAIAGH S., AUDRAIN M., RIMBERT M., LAFAYE-DE MICHEAUX S., TIOLLIER J., NÉGRIER S., - **Phase-I study of Innacell $\gamma\delta^{\text{TM}}$, an autologous cell-therapy product highly enriched in $\gamma 962$ T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma.** *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 57:11 (2008) 1599–1609.
7. BERNARREGGI D., POUYANFARD S., KAUFMAN D., - **Development of innate**

- immune cells from human pluripotent stem cells.** *Experimental Hematology*, 71 (2019) 13–23.
8. BIANCA N., - **Natural killer cell therapies catch up to CAR-T.** *The Scientist*. [Acedido a 29 de abril de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.the-scientist.com/bio-business/natural-killer-cell-therapies-catch-up-to-car-t-67332>
 9. VAN DER BIJ G., BÖGELS M., OTTEN M., OOSTERLING S., KUPPEN P., MEIJER S., BEELEN R., VAN EGMOND M., - **Experimentally induced liver metastases from colorectal cancer can be prevented by mononuclear phagocyte-mediated monoclonal antibody therapy.** *Journal of Hepatology*, 53:4 (2010) 677–685.
 10. BREMPELIS K., COWAN C., KREUSER S., LABADIE K., PRIESKORN B., LIEBERMAN N., ENE C., MOYES K., CHINN H., DEGOLIER K., MATSUMOTO L., DANIEL S., YOKOYAMA J., DAVIS A., HOGLUND V., SMYTHE K., BALCAITIS S., JENSEN M., ELLENBOGEN R., CAMPBELL J., PIERCE R., HOLLAND E., PILLARISETTY V., CRANE C., - **Genetically engineered macrophages persist in solid tumors and locally deliver therapeutic proteins to activate immune responses.** *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 8:2 (2020) 1–14.
 11. CAPSOMIDIS A., BENTHALL G., VAN ACKER H., FISHER J., KRAMER A., ABELN Z., MAJANI Y., GILEADI T., WALLACE R., GUSTAFSSON K., FLUTTER B., ANDERSON J., - **Chimeric Antigen Receptor-Engineered Human Gamma Delta T Cells: Enhanced Cytotoxicity with Retention of Cross Presentation.** *Molecular Therapy*, 26:2 (2018) 354–365.
 12. CARISMA, Therapeutics - **CARISMA Therapeutics.** [Acedido a 1 mai. 2021]. Disponível na Internet: <https://carismatx.com/science/>
 13. CHEN Q., HU Q., DUKHOVLINOVA E., CHEN G., AHN S., WANG C., OGUNNAIKE E., LIGLER F., DOTTI G., GU Z., - **Photothermal Therapy Promotes Tumor Infiltration and Antitumor Activity of CAR T Cells.** *Advanced Materials*, 31:23 (2019) 1–7.
 14. CHEN Y., YU Z., TAN X., JIANG H., XU Z., FANG Y., HAN D., HONG W., WEI W., TU J., - **CAR-macrophage: A new immunotherapy candidate against solid tumors.** *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 139: December 2020 (2021) 111605.
 15. CHO J., COLLINS J., WONG W., - **Universal Chimeric Antigen Receptors for**

- Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses.** Cell, 173:6 (2018) 1426-1438.
16. DENG Y., LIU W., LIAN Z., LI X., HOU X., - **Sorafenib inhibits macrophage-mediated epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma.** Oncotarget, 7:25 (2016) 38292–38305.
17. DENIGER D., MAITI S., MI T., SWITZER K., RAMACHANDRAN V., HURTON L., ANG S., OLIVARES S., RABINOVICH B., HULS H., LEE D., BAST R., CHAMPLIN R., COOPER, L., - **Activating and propagating polyclonal gamma delta T cells with broad specificity for malignancies.** Clinical Cancer Research, 20:22 (2014) 5708–5719.
18. FDA - **Highlights Of Prescribing Information KYMRIA[®] (tisagenlecleucel).** [Acedido a 2 de maio de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.fda.gov/media/107296/download>
19. FDA - **Highlights Of Prescribing Information TECARTUS[™] (brexucabtagene autoleucel).** [Acedido a 2 de maio de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.fda.gov/media/140409/download>
20. FDA - **Highlights Of Prescribing Information ABECMA[®] (idecabtagene vicleucel).** [Acedido a 2 de maio de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.fda.gov/media/147055/download>
21. FDA - **Highlights Of Prescribing Information YESCARTA[®].** [Acedido a 2 de maio de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.fda.gov/media/108377/download>
22. FDA - **BLA Clinical Review Memorandum BREYANZI[®].** [Acedido a 2 de maio de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.fda.gov/media/146424/download>
23. FINKERNAGEL F., REINARTZ S., LIEBER S., ADHIKARY T., WORTMANN A., HOFFMANN N., BIERINGER T., NIST A., STIEWE T., JANSEN J., WAGNER U., MÜLLER-BRÜSSELBACH S., MÜLLER R., - **The transcriptional signature of human ovarian carcinoma macrophages is associated with extracellular matrix reorganization.** Oncotarget, 7:46 (2016) 75339–75352.
24. GABITOVA L., MENCHEL B., GABBASOV R., PIERINI S., BEST A., ROSS K., OHTANI Y., BLUMENTHAL D., ABRAMSON S., CONDAMINE T., KLICHINSKY M., - **Anti-HER2 CAR monocytes demonstrate targeted anti-tumor activity and enable a single day cell manufacturing process [abstract].** [Acedido a 30 de

maio de 2021]. Disponível na Internet: https://cancerres.aacrjournals.org/content/81/13_Supplement/1530

25. GRIVENNIKOV S., WANG K., MUCIDA D., STEWART A., SCHNABL B., JAUCH D., TANIGUCHI K., YU G., ÖSTERREICHER C., HUNG K., DATZ C., FENG Y., FEARON E., OUKKA M., TESSAROLLO L., COPPOLA V., YAROVINSKY F., CHEROUTRE H., ECKMANN L., TRINCHIERI G., KARIN M., - **Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth.** *Nature*, 491:7423 (2012) 254–258.
26. GUEDAN S., POSEY A., SHAW C., WING A., DA T., PATEL P., MCGETTIGAN S., CASADO-MEDRANO V., KAWALEKAR O., URIBE-HERRANZ M., SONG D., MELENHORST J., LACEY S., SCHOLLER J., KEITH B., YOUNG R., JUNE C., - **Enhancing CAR T cell persistence through ICOS and 4-1BB costimulation.** *JCI insight*, 3:1 (2018) 1–17.
27. GYORI D., LIM E., GRANT F., SPENSBERGER D., ROYCHOUDHURI R., SHUTTLEWORTH S., OKKENHAUG K., STEPHENS L., HAWKINS, P., - **Compensation between CSF1R+ macrophages and Foxp3+ Treg cells drives resistance to tumor immunotherapy.** *JCI insight*, 3:11 (2018).
28. HECZEY A., LIU D., TIAN G., COURTNEY A., WEI J., MARINOVA E., GAO X., GUO L., YVON E., HICKS J., LIU H., DOTTI G., METELITSA L., - **Invariant NKT cells with chimeric antigen receptor provide a novel platform for safe and effective cancer immunotherapy.** *Blood*, 124:18 (2014) 2824–2833.
29. HECZEY A., COURTNEY A., MONTALBANO A., ROBINSON S., LIU K., LI M., GHATWAI N., DAKHOVA O., LIU B., RAVEH-SADKA T., CHAUVIN-FLEURENCE C., XU X., NGAI H., DI PIERRO E., SAVOLDO B., DOTTI G., METELITSA L.- **Anti-GD2 CAR-NKT cells in patients with relapsed or refractory neuroblastoma: an interim analysis.** *Nature Medicine*, 26:11(2020)1686-1690.
30. HEIDT A., - **CAR Macrophages Tackle Challenges in Solid Cancer Treatment.** *The Scientist Magazine®* [Acedido a 29 de abril de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.the-scientist.com/news-opinion/car-macrophages-tackle-challenges-in-solid-cancer-treatment-68604>
31. KAGOYA Y., TANAKA S., GUO T., ANCZUROWSKI M., WANG C., SASO K., BUTLER M., MINDEN M., HIRANO N., - **A novel chimeric antigen receptor**

containing a **JAK-STAT** signaling domain mediates superior antitumor effects. *Nature Medicine*, 24:3 (2018) 352–359.

32. KIM K., WEN X., YANG H., KIM W., KANG G., - **Prognostic implication of M2 macrophages are determined by the proportional balance of tumor associated macrophages and tumor infiltrating lymphocytes in microsatellite-unstable gastric carcinoma.** *PLoS ONE*, 10:12 (2015) 1–24.
33. KLICHINSKY, M., RUELLA, M., SHESTOVA, O., KENDERIAN, S., KIM, M., O'CONNOR, R., SCHOLLER, J., JUNE, C., GILL, S., - **Chimeric antigen receptor macrophages (CARMA) for adoptive cellular immunotherapy of solid tumors [Abstract 4575].** [Acedido a 30 de maio de 2021]. Disponível na Internet: https://cancerres.aacrjournals.org/content/77/13_Supplement/4575
34. KLICHINSKY M., RUELLA M., SHESTOVA O., LU X., BEST A., ZEEMAN M., SCHMIERER M., GABRUSIEWICZ K., ANDERSON N., PETTY N., CUMMINS K., SHEN F., SHAN X., VELIZ K., BLOUCH K., YASHIRO-OHTANI Y., KENDERIAN S., KIM M., O'CONNOR R., WALLACE S., KOZLOWSKI M., MARCHIONE D., SHESTOV M., GARCIA B., JUNE C., GILL S., - **Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy.** *Nature Biotechnology*, 38:8 (2020) 947–953.
35. KLINGEMANN, Hans - **Are natural killer cells superior CAR drivers?** *Oncolmunology*, 3:4 (2014) 37–41.
36. LAVIN Y., MERAD M., - **Macrophages: gatekeepers of tissue integrity.** *Cancer immunology research*, 1:4 (2013) 201–209.
37. LEE J.,- **When CAR meets stem cells.** *International Journal of Molecular Sciences*, 20:8 (2019).
38. LEE S., KIVIMÄE S., DOLOR A., SZOKA F., - **Macrophage-based cell therapies: The long and winding road.** *Journal of Controlled Release*, 240 (2016) 527–540.
39. LIN C., ZHANG J.,- **Chimeric antigen receptor engineered innate immune cells in cancer immunotherapy.** *Science China Life Sciences*, 62:5 (2019) 633–639.
40. LIU B.,; SONG Y., LIU D.,- **Clinical trials of CAR-T cells in China.** *Journal of Hematology and Oncology*, 10:1 (2017) 1–10.
41. MARTINEZ F., GORDON S., - **The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment.** *FI000Prime Reports*, 6:March (2014) 1–13.

42. METELITSA L., WU H., WANG H., YANG, Y., WARSI Z., ASGHARZADEH S., GROSHEN S., WILSON S. SEEGER R., - **Natural Killer T Cells Infiltrate Neuroblastomas Expressing the Chemokine CCL2.** *Journal of Experimental Medicine*, 199:9 (2004) 1213–1221.
43. MILLING L.,ZHANG Y., IRVINE D., - **Delivering safer immunotherapies for cancer.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 114 (2017) 79–101.
44. MOK S., KOYA R., TSUI C., XU J., ROBERT L., WU L., GRAEBER T., WEST B., BOLLAG G., RIBAS A., - **Inhibition of CSF-1 receptor improves the antitumor efficacy of adoptive cell transfer immunotherapy.** *Cancer Research*, 74:1 (2014) 153–161.
45. MOON E., WANG L., DOLFI D., WILSON C., RANGANATHAN R., SUN J., KAPOOR V., SCHOLLER J., PURÉ E., MILONE M., JUNE C., RILEY J., WHERRY J., ALBELDA S., - **Multifactorial T-cell hypofunction that is reversible can limit the efficacy of chimeric antigen receptor-transduced human T cells in solid tumors.** *Clinical Cancer Research*, 20:16 (2014) 4262–4273.
46. MORRISSEY M., WILLIAMSON A., STEINBACH A., ROBERTS E., KERN N., HEADLEY M., VALE R., - **Chimeric antigen receptors that trigger phagocytosis.** *bioRxiv*, 7 (2018) 1–21.
47. MOYES K., LIEBERMAN N., KREUSER S., CHINN H., WINTER C., DEUTSCH G., HOGLUND V., WATSON R., CRANE C., - **Genetically Engineered Macrophages: A Potential Platform for Cancer Immunotherapy.** *Human Gene Therapy*, 28:2 (2017) 200–215.
48. NATIONAL CANCER INSTITUTE - **CAR T Cells: Engineering Patients' Immune Cells to Treat Their Cancers.** [Acedido a 30 de abril de 2021]. Disponível na internet: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells>
49. NIU Z., CHEN G., CHANG W., SUN P., LUO Z., ZHANG H., ZHI L., GUO C., CHEN H., YIN M., ZHU W., - **Chimeric antigen receptor-modified macrophages trigger systemic anti-tumour immunity.** *The Journal of Pathology*, 00 (2020) 000–000.
50. NOGRADY, Bianca - **Natural Killer Cell Therapies Catch Up to CAR T.** [Acedido a 30 de maio de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.the-scientist>.

51. NYWENING T., BELT B., CULLINAN D., PANNI R., HAN B., SANFORD D., JACOBS R., YE J., PATEL A., GILLANDERS W., FIELDS R., DENARDO D., HAWKINS W., GOEDEGEBUURE P., LINEHAN D., - **Targeting both tumour-associated CXCR2+ neutrophils and CCR2+ macrophages disrupts myeloid recruitment and improves chemotherapeutic responses in pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Gut*, 67:6 (2018) 1112–1123.
52. O'NEILL K., WEBER S.,- **Macrophage CAR (MOTO-CAR) in immunotherapy.** *1:19* (2017) 2015–2018.
53. OHTANI Y., ROSS K., DANDEKAR A., GABBASOV R., KLICHINSKY M.,- **Development of an M1-polarized, non-viral chimeric antigen receptor macrophage (CAR-M) platform for cancer immunotherapy.** *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 8 (2020) A79–A79.
54. OKAMOTO S., AMAISHI Y., SHIGETA M., OKUBO Y., OHASHI Y., HIRANO N., MINENO J., - **Antigen- specific jakstat signals demonstrates superior antitumor effects with minimal undesired non-specific activation,** *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 8 (2020) A79–A79.
55. OLIVEIRA S., RYAN C., GIANNONI F., HARDEE C., TREMCINSKA I., KATEBIAN B., WHERLEY J., SAHAGHIAN A., TU A., GROGAN T., ELASHOFF D., COOPER L., HOLLIS R., KOHN D., - **Modification of hematopoietic stem/progenitor cells with CD19-specific chimeric antigen receptors as a novel approach for cancer immunotherapy.** *Human Gene Therapy*, 24:10 (2013) 824–839.
56. PIERINI S., GABBASOV R., GABITOVA L., OHTANI Y., GILL S., ABRAMSON S., CONDAMINE T., KLICHINSKY M., - **Chimeric antigen receptor macrophages (CAR-M) induce anti-tumor immunity and synergize with T cell checkpoint inhibitors in pre-clinical solid tumor models [abstract].** [Acedido a 30 de abril de 2021]. Disponível na Internet: https://cancerres.aacrjournals.org/content/81/13_Supplement/63
57. PRESS RELEASE, CARISMA THERAPEUTICS, 2021 - **CARISMA Therapeutics Announces First Patient Dosed in Landmark Clinical Study Evaluating Engineered Macrophages in Humans.** [Acedido a 30 de abril de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.prnewswire.com/news-releases/carisma-therapeutics-announces-first-patient-dosed-in-landmark-clinical-study-evaluating-engineered->

58. PYONTECK S., AKKARI L., SCHUHMACHER A., BOWMAN R., SEVENICH L., QUAIL D., OLSON O., QUICK M., HUSE J., TEIJEIRO V., SETTY M., LESLIE C., OEI Y., PEDRAZA A., ZHANG J., BRENNAN C., SUTTON J., HOLLAND E., DANIEL D., JOYCE J., - **CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression.** *Nature Medicine*, 19:10 (2013) 1264–1272.
59. RATAJCZAK M., - **Stem cells: therapeutic applications.** Stem Cell Institute at James Graham Brown Cancer Center, University of Louisville, Louisville, KY, USA: © Springer Nature Switzerland AG, 2019. ISBN 9783030312053.
60. ROYBAL K., RUPP L., MORSUT L., WALKER W., MCNALLY K., PARK J., LIM W., - **Precision Tumor Recognition by T Cells with Combinatorial Antigen-Sensing Circuits.** *Cell*, 164:4 (2016) 770–779.
61. SANTONI, M., MASSARI F., MONTORINI R., BATTELLI N. - **Manipulating macrophage polarization in cancer patients: From nanoparticles to human chimeric antigen receptor macrophages.** *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1876:1 (2021) 188547.
62. SINGH N., PERAZZELLI J., GRUPP S., BARRETT D., - **Early memory phenotypes drive T cell proliferation in patients with pediatric malignancies.** *Science Translational Medicine*, 8:320 (2016) 1–10.
63. SMYTH M., THIA K., STREET S., CRETNEY E., TRAPANI J., TANIGUCHI M., KAWANO T., PELIKAN S., CROWE N., GODFREY D., - **Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells.** *Journal of Experimental Medicine*, 191:4 (2000) 661–668.
64. SONG E., PHILIPSON B., RADHIKA T., BINDER Z., O’ROURKE D., MILONE M., - **Combining IAP Inhibitors with CAR T Cell Therapy to Treat Glioblastoma.** *Molecular Therapy*, 29:4S1 (2021) 75–76.
65. SONG L., ASGHARZADEH S., SALO J., ENGELL K., WU H., SPOSTO R., ARA T., SILVERMAN A., DECLERCK Y., SEEGER R., METELITSA L., - **V α 24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages.** *Journal of Clinical Investigation*, 119:6 (2009) 1524–1536.
66. STANLEY R., CHITU V., - **CSF-1 receptor signaling in myeloid cells.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6:a021857 (2014).

67. SU S., LIU Q., CHEN J., CHEN J., CHEN F., HE C., HUANG D., WU W., LIN L., HUANG W., ZHANG J., CUI X., ZHENG F., LI H., SU F., SONG E., - **A Positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis.** *Cancer Cell*, 25:5 (2014) 605–620.
68. TENG F., TIAN W., WANG Y., ZHANG Y., GUO F., ZHAO J., GAO C., XUE F., - **Cancer-associated fibroblasts promote the progression of endometrial cancer via the SDF-1/CXCR4 axis.** *Journal of Hematology and Oncology*, 9:1 (2016) 1–15.
69. VALERI E., UNALI G., PIRAS F., CUCCOVILLO I., LANDAU N., RUDNITSKI K., - **Combinatorial Relief of Multiple Innate Immune Blocks Allows Efficient Gene Engineering of Quiescent Human Hematopoietic Stem Cells.** *Molecular Therapy*, 29:4S1 (2021) 132–133.
70. WANG F., YANG L., GAO Q., HUANG L., WANG L., WANG J., WANG S., ZHANG B., ZHANG Y., - **CD163+CD14+ macrophages, a potential immune biomarker for malignant pleural effusion.** *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64:8 (2015) 965–976.
71. WEBB T., YUAN W., MEYER E., DELLABONA P., - **Editorial: NKT Cells in Cancer Immunotherapy.** *Frontiers in Immunology*, 11:1314 (2020) 10–12.
72. XU X., HUANG W., HECZEY A., LIU D., GUO L., WOOD M., JIN J., COURTNEY A., LIU B., DI PIERRO E., HICKS J., BARRAGAN G., NGAI H., CHEN Y., SAVOLDO B., DOTTI G., METELITSA L., - **NKT Cells Coexpressing a GD2-Specific Chimeric Antigen Receptor and IL15 Show Enhanced In Vivo Persistence and Antitumor Activity against Neuroblastoma.** *Clinical Cancer Research*, 25:23 (2019a) 7126-7138.
73. XU X., LI T., SHEN S., WANG J., ABDOU P., GU Z., MO R., - **Advances in engineering cells for cancer immunotherapy.** *Theranostics*, 9:25 (2019b) 7889–7905.
74. YANG L., WANG F., WANG L., HUANG L., WANG J., ZHANG B., ZHANG Y., - **CD163+ tumor-associated macrophage is a prognostic biomarker and is associated with therapeutic effect on malignant pleural effusion of lung cancer patients.** *Oncotarget*, 6:12 (2015) 10592–10603.
75. YANG L., ZHANG Y., - **Tumor-associated macrophages: from basic research**

to clinical application. Journal of hematology & oncology, 10:1 (2017) 58.

76. ZANGANEH S., HUTTER G., SPITLER R., LENKOV O., MAHMOUDI M., SHAW A., PAJARINEN J., NEJADNIK H., GOODMAN S., MOSELEY M., COUSSENS L., DALDRUP-LINK H., - **Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues.** Nature Nanotechnology, 11:11 (2016) 986–994.
77. ZHANG L., TIAN L., DAI X., YU H., WANG J., LEI A., ZHU M., XU J., ZHAO W., ZHU Y., SUN Z., ZHANG H., HU Y., WANG Y., XU Y., CHURCH G., HUANG H., WENG Q., ZHANG J., - **Pluripotent stem cell-derived CAR-macrophage cells with antigen-dependent anti-cancer cell functions.** Journal of Hematology and Oncology, 13:1 (2020) 1–5.
78. ZHANG W., LIU L., SU H., LIU Q., SHEN J., DAI H., ZHENG W., LU Y., ZHANG W., BEI Y., SHEN P., - **Chimeric antigen receptor macrophage therapy for breast tumours mediated by targeting the tumour extracellular matrix.** British Journal of Cancer, 121:10 (2019) 837–845.
79. ZHU Y., YANG J., XU D., GAO X., ZHANG Z., HSU J., LI C., LIM S., SHENG Y., ZHANG Y., LI J., LUO Q., ZHENG Y., ZHAO Y., LU L., JIA H., HUNG M., DONG Q., QIN L., - **Disruption of tumour-associated macrophage trafficking by the osteopontin-induced colony-stimulating factor-1 signalling sensitises hepatocellular carcinoma to anti-PD-L1 blockade.** Gut, 68:9 (2019) 1653–1666.

7. Anexo

Tabela I: Caracterização de Macrófagos M1 e M2.

Tipo de Macrófagos	M1	M2	Referências
Outras Designações	<ul style="list-style-type: none"> Macrófagos pró-inflamatórios; Classicamente ativados. 	<ul style="list-style-type: none"> Macrófagos anti-inflamatórios; Ativados alternativamente. 	(O'NEILL et al., 2017)
Características/ Funções	<ul style="list-style-type: none"> Altamente fagocíticos; Reconhecimento e destruição de células cancerígenas; Supressão tumoral; Controlo de metástases; Controlo/combate de infeções e atividade antimicrobiana; Aumento da expressão de genes envolvidos no processamento e apresentação de antígenos e de moléculas co-estimulatórias. 	<ul style="list-style-type: none"> Angiogénese; Reparação tecidual; Reprogramação do microambiente imunossupressor; Imunorregulação; Progressão tumoral; Eliminação de parasitas. 	(KIM et al., 2015; MARTINEZ et al., 2014)
Substâncias secretadas	<ul style="list-style-type: none"> Citocinas e Quimiocinas pró-inflamatórias (ex.: IL1β, IL2, IL6, IL12, IL23, TNFα, CXCL9, CXCL10); TGFβ; ROS e RNS; IFNγ. 	<ul style="list-style-type: none"> Citocinas e Quimiocinas anti-inflamatórias (ex.: IL4, IL5, IL10, IL13, IL6, CCL2, CCL21, CXCL12, CXCL1); TGFβ; ARG-I; Fatores angiogénicos; CSFI. 	(KIM et al., 2015; YANG et al., 2015; ZANGANEH et al., 2016; ZHU et al., 2019)
Resposta celular promovida	<ul style="list-style-type: none"> Th1 (CD8+). 	<ul style="list-style-type: none"> Th2 (CD4+). 	(O'Neill e Weber, 2017)
Fatores que induzem polarização (in vitro)	<ul style="list-style-type: none"> Citocinas e Quimiocinas pró-inflamatórias (ex.: IL1β, IL12β, IL18) IFNγ; TNFα; LPS; Fatores de transcrição; miRNAs; Ligações a TLR; CSF2. 	<ul style="list-style-type: none"> Citocinas e Quimiocinas anti-inflamatórias (ex.: IL2, IL4, IL5, IL8, IL10, IL13) CSFI. 	(BAZZI et al., 2017; KIM et al., 2015; O'NEILL et al., 2017; ZHU et al., 2019)
Marcadores	<ul style="list-style-type: none"> iNOS; CD16/CD32; CD80 e CD86; IL1β e IL12β; TNFα. 	<ul style="list-style-type: none"> ARG1; CD206 e CD163; IL10 e IL4; CCL22. 	(FINKERNAGEL et al., 2016; NIU et al., 2020; ZANGANEH et al., 2016; ZHU et al., 2019)

Legenda: ARG-I: Arginase-I; CCL: motivo de ligação à quimiocina; CSF: fator estimulante de colónias; CXCL: motivo de ligação C das quimiocinas; IFN: Interferão; IL: Interleucina; iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase; LPS: Lipopolissacarídeo; miRNAs: *micro* RNAs; RNS: espécies reativas de nitrogénio; ROS: espécies reativas de oxigénio; Th: T *helper*; TME: microambiente tumoral; TLR: Toll-Like Receptor; TGF: Transforming Growth Factor; TNF: Fator de Necrose Tumoral.

Tabela II: Tabela resumo de estudos de plasticidade fenotípica de CAR-M. Parte superior da tabela relativa a ensaios *in vitro* e a inferior a ensaios *in vivo*.

Estudo	Células utilizadas	Estimulação	Conclusões	Referências
Alterações no fenótipo dos macrófagos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Macrófagos RAW264.7 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anti- HER2 CAR-M(CD147) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anti-HER2 CAR-M(CD147) ativam especificamente a expressão de MMP. 	(ZHANG et al., 2019)
Plasticidade fenotípica	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Macrófagos humanos transduzidos com Ad5f35 ou macrófagos controle 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fatores indutores M2 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Apenas os macrófagos UTD apresentaram expressão aumentada de CD206 e aumentaram o consumo basal de oxigênio. 	(KLICHINSKY et al., 2020)
Estudo	Modelos <i>In vivo</i>	Conclusões		
Análise da indução de um fenótipo M1 pelo Ad5f35	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Macrófagos de 10 doadores humanos 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Macrófagos transduzidos agrupam-se distintamente dos UTD; ▪ O fenótipo é induzido pelo vetor viral e não pelo que o CAR expressa; ▪ O fenótipo M1, foi mantido no mínimo 40 d após a transdução. 	(KLICHINSKY et al., 2020)	

Legenda: CAR: Recetor quimérico de antígeno; d: dia; HER2: recetor do fator de crescimento epidérmico humano 2; MMP: Metaloproteinases da Matriz; UTD: Não transduzidos.