



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Daniel da Silva Gonçalves

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Células CAR-NK – Nova proposta terapêutica em oncologia” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Cláudia Gama, da Dra. Ana Leite e Silva 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 2019



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Daniel da Silva Gonçalves

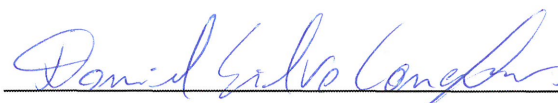
Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Células CAR-NK – Nova proposta terapêutica em oncologia” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, da Dra. Cláudia Gamažda Dra" Ana Leite e Silva e do Professor Doutor João Nuno Moreira apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019

Eu, Daniel da Silva Gonçalves, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº2012160986 declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Células CAR-NK – Nova proposta terapêutica em oncologia” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 3 de setembro de 2019.

A handwritten signature in blue ink, reading "Daniel da Silva Gonçalves", written over a horizontal line.

(Daniel da Silva Gonçalves)

“É preciso que o discípulo da sabedoria tenha o coração grande e corajoso. O fardo é pesado e a viagem longa.

Não te preocupes com os que não te conhecem, mas esforça-te por seres digno de ser conhecido.

Há três métodos para ganhar sabedoria: primeiro, por reflexão, que é o mais nobre; segundo, por imitação, que é o mais fácil; e terceiro, por experiência, que é o mais amargo.

Já é sabedoria quando se sabe que não se sabe alguma coisa.”

Confúcio

Agradecimentos

Este foi um estágio que foi muito desejado e que provocou grandes alterações pessoais e mudanças de projetos pessoais. É fundamental que agradeça por todo o apoio que me foi dado previamente à realização deste mesmo estágio, como suporte e apoio para o realizar, bem como durante a sua duração. Assim, quero agradecer obviamente à minha família por estarem sempre presentes. Aos amigos que estiveram sempre do meu lado, que são como uma família já, também, e sem os quais tudo seria muito difícil. Eles sabem quem são porque somos quatro pessoas muito especiais umas para as outras, mas obrigado Ana Rita, Ana Marília e Rafael.

Particularmente ligadas ao estágio claro que tenho de agradecer a toda a equipa do Controlo de Qualidade, área na qual fui inserido no meu estágio, e na qual conheci uma equipa cheia de pessoas dispostas a ajudar o próximo. Obrigado à Dra. Cláudia Gama por toda a simpatia, disponibilidade, amabilidade e oportunidades criadas para a nossa formação ser o mais completa possível. Obrigado também à minha tutora, Ana Rita Alves, que desde o primeiro momento sempre foi um grande apoio, com uma simpatia e preocupação acima da média, que me fez sempre sentir em casa e saber que teria sempre alguém com quem podia contar. Além disso sempre me ajudou em dúvidas que foram surgindo ao longo da minha formação. No geral toda a equipa me ajudou na minha formação sendo em maior ou menor percentagem, mas muito obrigado Vânia Ribeiro, Ana Teresa Santiago, Mafalda Vaz, Teresa Coelho, Diana Luzio, entre outras pessoas, por toda a contribuição para o meu conhecimento, por partilharem o vosso saber e pela vossa disponibilidade em ajudar.

Sem querer fazer agradecimentos exagerados, quero salientar que para além destas pessoas já mencionadas, outras há que foram muito importantes no sucesso do meu estágio e no meu bem-estar ao longo deste, tais como a Ana Filipa Ribeiro, Catarina Jesus, Sandra Soeiro, Ana Margarida, Cláudia Simões, Joana Silva, Marisa, Patrícia Marques, as quais em conjunto com quem já mencionei se tornaram em pessoas queridas e as quais me vou lembrar sempre seja qual for o meu futuro.

Por fim, obrigado Bluepharma pela oportunidade.

Particularmente ligadas ao estágio em farmácia comunitária, claro que tenho de agradecer a toda a equipa da farmácia, na qual fui inserido no meu estágio, e na qual conheci uma equipa cheia de pessoas dispostas a ajudar o próximo. Sempre me ajudaram em todas as dúvidas que foram surgindo e sempre me ajudaram a conseguir ser um melhor profissional, como farmacêutico. Agradeço a forma excelente como me deixaram integrar e fazer parte da equipa, bem como pela boa disposição que sempre demonstraram. Obrigado também à Dra. Ana Leite

e Silva por toda a simpatia, disponibilidade, amabilidade e oportunidades criadas para a minha formação ser o mais completa possível.

Resumindo, obrigado Farmácia Coimbra pela oportunidade.

Muito obrigado também ao Professor Doutor João Nuno Moreira por toda a orientação que me prestou e por todo o apoio que me facultou sempre que necessitei, ou que me surgiu qualquer dúvida.

Capítulo I – Relatório de estágio em Indústria Farmacêutica

Capítulo II – Relatório de estágio em Farmácia Comunitária

Capítulo III – Monografia “Células CAR-NK – Nova proposta terapêutica em oncologia”

Índice Geral

Agradecimentos	3
Índice de Figuras.....	8
Índice de Tabelas.....	8
Capítulo I - Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica	
Abreviaturas.....	11
Introdução	12
Análise SWOT.....	13
Forças.....	14
Fraquezas.....	16
Oportunidades	18
Ameaças.....	19
Considerações Finais.....	21
Capítulo II - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária	
ABREVIATURAS.....	23
INTRODUÇÃO.....	24
ENQUADRAMENTO GERAL.....	25
ANÁLISE SWOT	27
<i>Diagrama Síntese da Análise SWOT.....</i>	<i>28</i>
Forças.....	28
<i>Localização e horário de funcionamento.....</i>	<i>28</i>
<i>Diversidade e grande afluência de utentes.....</i>	<i>29</i>
<i>Integração na equipa de trabalho.....</i>	<i>29</i>
<i>Sistema informático – Sifarma 2000® - Equipamento – Robô.....</i>	<i>29</i>
<i>Aprovisionamento, armazenamento e gestão de stocks.....</i>	<i>31</i>
<i>Prestação de serviços de saúde.....</i>	<i>32</i>
<i>Plano de estágio estruturado.....</i>	<i>32</i>
Fraquezas.....	33
<i>Associação do princípio ativo ao nome comercial.....</i>	<i>33</i>
<i>Conhecimento insuficiente de MNSRM.....</i>	<i>33</i>
Oportunidades	34
<i>Maior formação na área de MNSRM e dermocosmética.....</i>	<i>34</i>
<i>Formações externas sobre MNSRM e dermoscosmética.....</i>	<i>34</i>

Ameaças.....	34
<i>Concorrência de espaços de venda de MNSRM nas proximidades.....</i>	<i>34</i>
<i>Prescrição por DCI (denominação comum internacional).....</i>	<i>35</i>
CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
Capítulo III - Monografia final “Células CAR-NK - Nova proposta terapêutica em oncologia”	
Abreviaturas.....	38
Resumo	39
Abstract	40
1. Introdução	41
1.1.Células NK	41
1.2.Células CAR-NK.....	43
2. CAR – Desenvolvimento.....	45
2.1.Tecnologia CAR e seu desenvolvimento.....	45
2.2.Obtenção de células NK	47
2.3.Produção de células CAR-NK.....	48
2.4.Formas de utilização.....	50
3. Aplicações terapêuticas em oncologia.....	51
3.1.Cancros com possível aplicação	51
3.2.Condições biopatológicas para proposição de tratamento CAR-NK	51
4. Análise comparativa CAR-T vs CAR-NK.....	52
5. Empresas existentes na área da biotecnologia celular aplicada às Car-NK.....	53
5.1.Patentes associadas.....	53
5.2.Produutos lançados.....	56
6. Ensaio Clínicos	57
7. Perspetivas Futuras	62
8. Conclusão	62
9. Bibliografia.....	63

Índice de Figuras

Capítulo II

Figura 1 - As infraestruturas da Farmácia Coimbra	26
---	----

Capítulo III

Figura 1 - Mecanismo de ação das células NK (adaptado de " https://fatetherapeutics.com/pipeline/immuno-oncology-candidates/nk100/ ").....	43
Figura 2 - Estrutura de recetores CAR na superfície celular (Adaptado de "Chimeric antigen receptor (CAR)-transduced natural killer cells in tumor immunotherapy") (3)	44
Figura 3 - Fatores que influenciam o bom desenvolvimento e funcionamento de células NK (Adaptado de "NK cell-based immunotherapy for cancer")(2).....	46
Figura 4 - Processo de produção GMP de células CAR-NK (Adaptado de "Advantages and applications of CAR-expressing natural killer cells")(15).....	50
Figura 5 - Célula T	52
Figura 6 - Célula NK	52

Índice de Tabelas

Capítulo II

Tabela 1 - Equipa da Farmácia Coimbra	25
---	----

Capítulo III

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens de CAR T e NK(3, 15)	52
Tabela 2 - Carsgen therapeutics.....	53
Tabela 3 - Asclepius Solutions, Inc.....	53
Tabela 4 - Shenzhen Teihua Cell Enginnering Co., Ltd.	54
Tabela 5 - ATCG Suzhou Biotechnology	55
Tabela 6 - Immunomedics.....	55
Tabela 7 - Cerus Corporation.....	55
Tabela 8 - Ensaio clínico 1	57
Tabela 9 - Ensaio clínico 2	57

Tabela 10 - Ensaio clínico 3	58
Tabela 11 - Ensaio clínico 4	58
Tabela 12 - Ensaio clínico 5	58
Tabela 13 - Ensaio clínico 6	59
Tabela 14 - Ensaio clínico 7	59
Tabela 15 - Ensaio clínico 8	59
Tabela 16 - Ensaio clínico 9	60
Tabela 17 - Ensaio clínico 10	60
Tabela 18 - Ensaio clínico 11	61
Tabela 19 - Ensaio clínico 12	61
Tabela 20 - Ensaio clínico 13	61



Capítulo I

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Dra. Cláudia Gama

Daniel da Silva Gonçalves | Estágio curricular | 2019

Abreviaturas

CQ – Controlo de Qualidade

DAG – Desenvolvimento Analítico e Galénico

EPI – Equipamento de Proteção Individual

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

GC – Cromatografia Gasosa

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Pressão

ID – Investigação e Desenvolvimento

KF – Karl-Fischer

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

PSD – Distribuição de Tamanho de Partícula

TOC – Carbono Orgânico Total

UDU – Uniformidade de dose unitária

UV – Espectrofotómetro de luz ultravioleta

Introdução

O estágio curricular em indústria farmacêutica decorreu em Coimbra, na Bluepharma, empresa situada em S. Martinho do Bispo. O estágio decorreu entre 7 de janeiro de 2019 e 29 de março de 2019.

A Bluepharma é uma indústria farmacêutica que tem como sua principal atividade a produção de formas orais sólidas, tais como comprimidos e cápsulas, tendo também desenvolvido formulações como filmes orais e futuramente serão desenvolvidos produtos como injetáveis complexos. A Bluepharma é uma empresa com várias certificações, estando certificada com ISO 9001, 14001, OHSAS 18001, NP 4457 e ainda pela EMAS. Está autorizada pelas autoridades competentes para produzir medicamentos em Portugal, pelo INFARMED, na Europa pela EMA, nos Estados Unidos pela FDA, no Brasil pela ANVISA. A empresa é constituída, neste momento, por uma unidade fabril localizada em S. Martinho do Bispo e por um armazém dedicado aos medicamentos genéricos, localizado em Taveiro. Cerca de 80% da produção da empresa está destinada à exportação, sendo esta uma empresa em franco desenvolvimento não só nacional, mas também internacional, com uma expansão já planeada para um futuro próximo, de forma a dar resposta a este crescimento.

No meu estágio fui alocado ao sector de Controlo de Qualidade (CQ), o qual é composto por grupos de trabalho que estão mais dirigidos a determinado tipo de análises, como sejam a rotina, implementações, dissoluções e microbiologia. Assim, na rotina são realizadas todas as análises que se destinam à libertação de lotes, quer estes sejam de matérias-primas, produto semiacabado ou em “bulk”, e ainda produto acabado. Estas análises são muito diversificadas e estão descritas em SOP's específicas de cada produto em análise, podendo incluir análises de perda por secagem, ignição, determinação de cinzas, FTIR, polarimetria, determinação de água, avaliação de conteúdo por HPLC ou potenciometria, UDU, determinação de impurezas ou outras. As implementações são responsáveis por fazer a implementação de novos métodos a serem utilizados posteriormente em rotina, sendo a gama de análises que se realizam a mesma de todas as que se realizam em rotina, procedendo à validação dos métodos, a sua verificação, o seu ajuste, sendo estes depois transpostos para novas SOP de análise do produto em questão. Também é este grupo que realiza a transferência de tecnologias para a Bluepharma, bem como realiza a análise de lotes piloto ou “stop control”. As dissoluções estão incumbidas de realizar todas as dissoluções de todos os produtos para os quais seja necessária esta análise, sendo eles lotes de rotina ou lotes piloto, por exemplo. A microbiologia está dedicada a estudos microbiológicos a todos os produtos para os quais a análise seja requerida. Dado o foco de produção da empresa poder-se-ia pensar que não faria muito sentido realizar análises este

género, mas na verdade há variados produtos que possuem intrinsecamente alguma propensão para serem contaminados por microrganismos. Mais ainda, certos produtos podem não precisar deste tipo de análises para comercialização em determinados países, mas noutros esta análise ser requerida, logo é necessário haver um sector dedicado a estas análises na empresa. O circuito de amostras no CQ começa pela sua amostragem, sector que se encontra localizado no armazém, mais próximo assim dos produtos e onde está localizada a sala de amostragem. São amostradas matérias-primas (excipientes ou API's), material de embalagem primário ou secundário. Estas são colhidas de acordo com procedimentos de amostragem específicos e registadas em folhas de amostragem, para recipientes apropriados, como frascos âmbar por exemplo, na quantidade necessária para a realização das análises requeridas para o produto em causa. Estas são colocadas no armário de amostras, de onde são depois retiradas pelos analistas para realização dos testes necessários e onde voltam a ser arrumadas, em prateleira diferente, aquando do final de todas as análises. A recolha das amostras pelos analistas não é aleatória e vai de acordo ao plano semanal que é atribuído a cada um. Após verificação e revisão de todas as análises e de todos os resultados as amostras são enviadas para destruição de acordo com o método apropriado para tal. Para estas amostras são ainda emitidos certificados de análise a atestar a sua conformidade.

Análise SWOT

O restante do relatório será escrito sob a forma de uma análise SWOT, correspondente a *Strengths* (Forças), *Weaknesses* (Fraquezas), *Opportunities* (Oportunidades) e *Threats* (Ameaças). Este tipo de análise permite fazer uma avaliação detalhada e perspicaz de tudo o que beneficia, dificulta ou ameaça o estágio, ou a empresa no geral, bem como as oportunidades que podem ser uma melhoria em ambas as situações também, sendo esta uma forma resumida de fazer este tipo de reflexão. Apresento em seguida um quadro resumo desta análise, passando a uma explicação mais detalhada de cada ponto posteriormente.



FORÇAS

- **Formação**

Ao longo do período de estágio a empresa investe imenso na formação dos seus estagiários, assim como dos seus novos colaboradores, sendo que para a empresa não há distinção entre estes quando se trata da sua formação inicial e fundamental. Assim, vão sendo agendadas variadas e múltiplas formações ao longo do tempo acerca de vários temas, fundamentais para que se possa exercer um bom trabalho em indústria farmacêutica e numa empresa como a Bluepharma. Estas formações vão desde a apresentação da empresa e dos seus sectores, gestão de resíduos, utilização de EPI's, assuntos regulamentares, investigação e inovação, história e evolução da Bluepharma, até uma visita completa às instalações e aos seus diversos sectores. Desta forma, a carga de formação e preparação fornecida é grande e de grande valor, fazendo com que não só os estagiários tenham a oportunidade de aprender mais, mas também da empresa garantir a qualidade do pessoal que contrata para si e a qualidade do seu desempenho.

- **Planeamento semanal das actividades**

Na Bluepharma, mais concretamente no CQ, cada colaborador tem um plano semanal de actividades definido pela coordenadora responsável por cada grupo de trabalho, sendo desta

forma fácil para cada colaborador saber quais as tarefas que tem de cumprir durante aquela semana e poder organizar o seu trabalho de forma a cumprir esse objetivo. Não há espaço para dúvidas ou equívocos quanto ao que cada um tem por sua responsabilidade fazer. No entanto, todos os dias são realizadas reuniões Kaizen, reuniões estas que pretendem ser rápidas, mas concisas, e que permitem o acompanhamento dos trabalhos de cada colaborador de forma a perceber quais os problemas que podem estar a surgir na realização de determinada análise, promovendo o diálogo entre os colaboradores acerca destas matérias e permitindo o esclarecimento de dúvidas acerca deste tipo de problemas. Para além disso estas permitem ainda definir quais os produtos ou análises prioritárias e que necessitam de tentar ser cumpridas em primeiro lugar, dando desta forma uma orientação extra aos colaboradores quanto ao que deve ser o seu foco de trabalho.

- **Espírito de equipa**

Dentro do CQ existe um grande espírito de equipa, dado que se algum problema surge com algum colega há sempre alguém na disposição de prestar a sua ajuda e tentar fazer com que as coisas se resolvam e que tudo possa prosseguir normalmente, que vai desde os colegas até às chefias. Este tipo de ambiente permite que o estágio seja também muito mais produtivo e muito mais recompensador pois todos os elementos se empenham em que a aprendizagem retirada seja a máxima.

- **Autonomia**

Apesar de todos os estagiários serem acompanhados sempre por algum colaborador, a partir do momento em que as técnicas foram apreendidas por nós estagiários é-nos dada grande autonomia na realização dessas mesmas análises, passando nós a colaborar diretamente para o trabalho diário realizado na empresa, algo que é bastante compensador para quem está a aprender, pois permite a aquisição de confiança no trabalho realizado e integração na equipa de trabalho. Este trabalho é sempre revisto e supervisionado pelo colaborador responsável por nos acompanhar de forma a garantir que tudo é feito da forma apropriada.

- **Acolhimento**

Desde a receção dos alunos até à integração nas diferentes equipas de trabalho, os estagiários são sempre acompanhados e são esclarecidas todas as dúvidas e formas de funcionamento da empresa. Os estagiários têm um tutor atribuído que é responsável por fazer a sua integração em toda a equipa, desde a apresentação dos colaboradores que pertencem à equipa, um almoço com o estagiário, apresentação do plano de estágio atribuído e acompanhamento ao longo do estágio em qualquer situação necessária. Há um clima de acompanhamento constante ao estagiário, sendo este bastante confortante para quem é novo na empresa.

- **Controlo de acessos**

A Bluepharma tem um sistema de controlo de acessos espalhado pelas suas instalações, de forma a limitar o acesso por parte de pessoal estranho ao serviço ou de pessoal alheio ao tipo de análises realizadas em determinado laboratório. Desta forma, está assegurado o acesso apenas a pessoal competente e responsável por determinado tipo de análises e pertencente a determinada equipa de trabalho, reduzindo as hipóteses de contaminação ou intrusão em espaços com ambiente controlado, por exemplo.

FRAQUEZAS

- **Falta de espaço**

A Bluepharma, devido ao facto de se localizar em antigas instalações da Bayer, apesar de devidamente ajustadas para os tempos mais atuais, sofre neste momento de uma grande crise de espaço, muito devido à sua franca expansão e aumento de volume de negócio. Assim, em vários sectores, não sendo o CQ uma exceção, existe falta de espaço para acomodar mais equipamentos e locais de trabalho para os colaboradores, falta de bancada de trabalho individualizada e com as dimensões mais apropriadas para cada trabalhador, bem como falta de cacifos individualizados para cada colaborador. Esta situação já levou inclusive a uma tentativa de aumentar os espaços existentes com a adição de salas de trabalho ao longo das laterais do edifício principal e em posição superior aos locais já existentes anteriormente.

Tudo isto de forma a tornar possível a acomodação de novos colaboradores ou libertar espaços para maior capacidade de trabalho.

- **Duração do estágio**

O estágio realizado tem a duração de 3 meses, sendo este o tempo mínimo acordado entre a empresa e a faculdade. Apesar de esta oportunidade ser única e de grande valor, também é necessário referir que este período de estágio se torna curto para toda a quantidade de conhecimento que se pretende que seja fornecida aos estagiários. Isto deve-se ao facto de haver uma grande panóplia de técnicas e métodos envolvidos na análise de produtos farmacêuticos e na análise da sua qualidade, assim como uma grande variedade de produtos produzidos pela Bluepharma, havendo uma necessidade de mais tempo para que possa haver acompanhamento e interiorização de todos os processos envolvidos no CQ e de uma indústria farmacêutica no geral.

- **Impossibilidade de acompanhar o percurso do produto dentro dos vários sectores**

Dada a dimensão da empresa, o seu volume de negócio e volume de trabalho associado, torna-se impossível acompanhar o percurso de um produto desde que este é rececionado na empresa até à sua transformação, controlo e libertação para o mercado. Esta visão seria uma ajuda muito grande para uma melhor compreensão de todos os processos envolvidos numa indústria deste género e na perceção de tudo o que é necessário fazer para garantir que os produtos produzidos e libertados são o melhor possível para o utente, utilizador final dos mesmos. Contudo, ressalvo mais uma vez que a formação agendada para nós estagiários pela Dra. Cláudia Gama foi muito relevante neste sentido, uma vez que, pudemos visitar durante 1 dia os vários sectores que estão relacionados com o CQ e desta forma perceber como chegam as amostras até lá e como são depois libertados os lotes e o processo que está envolvido com esse produto libertado.

- **Condições de acesso dos trabalhadores**

Apesar de todos os esforços desenvolvidos pela empresa, os acessos às instalações da mesma não são facilitados para os trabalhadores, no sentido em que, a empresa está localizada numa zona habitacional e escolar pelo que é densamente habitada, tornando o estacionamento extremamente difícil para os colaboradores, visto que a empresa não tem condições para acomodar um parque de estacionamento que satisfaça as necessidades.

OPORTUNIDADES

- **Informatização de registos de utilização (*logbooks*)**

Uma mudança que teria valor acrescentado, no meu ponto de vista, para o trabalho diário da empresa e agilidade do mesmo, é a informatização de registos de acesso e utilização aos equipamentos da empresa, uma vez que esta alteração iria permitir uma redução da carga burocrática para os trabalhadores, dado que cada equipamento tem associado a si um *logbook* onde tem de ser obrigatoriamente registada a data da utilização do mesmo bem como a duração desta utilização, qual o produto e análise que foi realizada no mesmo. Para além desta situação, no caso das análises de HPLC em concreto, as colunas utilizadas ainda têm associadas a si um diário de coluna onde são registadas informações não só da sua utilização, mas também das condições em que foram utilizadas, tais como a variação da pressão e o número de injeções. Posto isto, existe uma grande parte do tempo diário dos colaboradores que passa por manter estes registos atualizados, sendo que estes têm de ser realizados aquando da utilização, ou seja, sem que estas tarefas sejam feitas não é possível avançar para a tarefa seguinte. Apesar de esta ser uma resolução muito difícil e quem sabe até impossível de por em prática, seria sem dúvida uma grande ajuda e uma automatização e redução do papel que é necessário para cumprir estes requisitos. São registos obrigatórios claro para todas as certificações e autorizações que a empresa possui, mas poderia ser explorada a hipótese de estes serem armazenados informaticamente como forma de mostrar evidências aquando de auditorias realizadas à empresa.

- **Aprendizagem de várias técnicas analíticas**

Dada a grande variedade de produtos, técnicas e métodos existentes e já referidos, este estágio dá a oportunidade única de aprender e experienciar diversas técnicas analíticas, tais como HPLC, GC, TOC, KF, polarimetria, potenciometria, PSD, perda por secagem, perda por ignição, FTIR, dissolução, desagregação, UV. Nem todas as técnicas podem ser acompanhadas ao pormenor obviamente pois não há tempo necessário para isso, mas permite alargar o conhecimento de técnicas analíticas que trazemos como estagiários da formação adquirida no MICF na FFUC. Permite desta forma um grande desenvolvimento pessoal no trabalho em laboratório, desde a organização até à agilidade na realização do mesmo.

AMEAÇAS

- **Constante alteração de normas, SOP's e procedimentos**

No mundo atual e na indústria farmacêutica é necessário haver uma atualização constante de todas as normas e procedimentos e formas de realizar controlo dos produtos devido à constante evolução dos mesmos. Devido a este fator, a empresa tem uma necessidade constante de verificar se as normas que se aplicam e os procedimentos que utiliza estão atualizados e correspondem ao necessário para que os seus produtos possam ser colocados em mercado e utilização. Isto é uma ameaça para o funcionamento e sucesso da empresa que para além de verificar estas situações tem ainda de agilizar atualizações sempre que necessário. Isto também se torna numa dificuldade para os colaboradores, visto que, estes, têm de estar muito atentos a todos os procedimentos que utilizam fazendo sempre a verificação das versões mais atualizadas, que são disponibilizadas online pela Bluepharma, de forma a evitar produção de trabalho em vão, com prejuízo da empresa e necessidade de executar repetições de análise desnecessárias.

- **Carga burocrática excessiva**

Todos os colaboradores estão sujeitos a uma carga burocrática excessiva devido à necessidade de registar cada passo da análise que se encontram a realizar, preenchimento de *logbooks*, preenchimento de folhas de preparação de soluções, abertura de soluções, criação de

etiquetas para as soluções preparadas, assinatura de todos os registos de pesagem, identificação de amostras, datação e assinatura de todos os *reports* emitidos pelos equipamentos e ainda preenchimento de todas as folhas de cálculo existentes para o produto após a criação das mesmas, bem como o registo informático de todas as horas de trabalho e a sua alocação a projetos ou análises em concreto. Tudo isto leva a que haja muito tempo em que não existe produção de trabalho no seu sentido mais literal, mas que é necessário para que a revisão destas análises e aprovação das mesmas seja possível. É uma ameaça à produtividade e à geração de erros não analíticos, mas burocráticos, que podem levar a confusões e investigações de erro que podem não afetar diretamente a qualidade do produto produzido.

- **Capacidade de transporte de produtos reduzida**

A Bluepharma como empresa, e devido à sua localização e dimensão dos edifícios, tem neste momento uma capacidade de transporte de produtos um pouco limitada, uma vez que, apenas dispõe de uma carrinha de transporte de produtos que permite a deslocação de material entre a sede da empresa e Taveiro. Esta carrinha de transporte tem uma capacidade de transporte limitada, o que leva a que sejam necessárias múltiplas viagens no caso de encomendas de grandes dimensões. Com o aumento do volume de negócio esta situação pode tornar-se complicada de gerir por parte da empresa pelo que será necessário fazer uma introspeção sobre este assunto.

- **Pressão sobre os trabalhadores para cumprir prazos**

O grande ritmo de trabalho que a Bluepharma apresenta e grande volume de produtos diversificados, leva a que, sejam cada vez mais apertados os prazos a cumprir para entrega de resultados e realização de análises. Este facto pode dever-se a clientes que estão a aguardar a entrega destes resultados ou até mesmo ao setor da produção que aguarda os resultados das matérias-primas de forma a saber se podem ser utilizadas ou não, ou ainda devido a necessidade de obter resultados sobre lotes piloto ou sobre “stop control”. Desta forma gera-se uma grande pressão nos colaboradores para que sejam realizadas as análises necessárias, que estas corram sem problemas e que os resultados sejam os pretendidos e entregues o mais rápido possível. Esta pressão nem sempre é fácil de lidar e há colaboradores que podem não

se adaptar à mesma e não conseguir trabalhar com a mesma eficácia e prontidão de resposta devido a isto.

Considerações Finais

O meu estágio na Bluepharma foi algo que queria muito fazer e do qual não me arrependo, pois, a indústria farmacêutica é uma área que realmente me fascina e na qual facilmente me vejo inserido no meu futuro se tal for proporcionado. Este foi um estágio que me despertou o interesse desde o início e no qual me pude desenvolver mais pessoalmente e profissionalmente pois esta é uma área com a qual dificilmente temos contacto, se não estivermos no interior de uma empresa, como a Bluepharma, empresa esta de grande prestígio e com selo de qualidade garantida em todos os seus produtos e processos. O setor de CQ é fundamental nessa garantia de qualidade e estando inserido nele pude comprovar a qualidade dos processos e das matérias utilizadas e por em prática essa mesma avaliação. Após a conclusão deste estágio sinto-me realizado e com vontade de continuar, pois sei que ainda há muito mais para aprender e mais que poderia fazer para ajudar uma empresa como esta. Finalmente, no decorrer deste estágio pude também sentir-me envolvido realmente na comprovação de qualidade, eficácia e segurança dos medicamentos, sentimento este que considero fundamental enquanto futuro farmacêutico.



Capítulo II

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Dra. Ana Leite e Silva

Daniel da Silva Gonçalves | Estágio curricular | 2019

ABREVIATURAS

DCI – Denominação Comum Internacional

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

MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

MSRM – Medicamento Sujeito a Receita Médica

SWOT – *Strenghts, Weakness, Opportunities, Threats*

VALORMED – Sociedade Gestora de Resíduos de Embalagens e Medicamentos, Lda.

INTRODUÇÃO

O estágio em farmácia comunitária permite ao estagiário contactar diretamente com os utentes e proceder pela primeira vez à intervenção farmacêutica na comunidade, como é o caso do papel na terapêutica de doenças, na sua prevenção, na promoção da saúde e bem-estar e na deteção de incompatibilidades e reações adversas a medicamentos.

Nesta etapa, contamos com o apoio da equipa técnica que acompanha o estágio e que é imprescindível para a aprendizagem e amadurecimento do estagiário enquanto profissional de saúde.

O presente relatório reporta ao estágio curricular em farmácia comunitária, realizado na Farmácia Coimbra entre o dia 1 de abril e 14 de agosto de 2019, sob orientação da Dra. Ana Leite e Silva.

O meu estágio compreendeu três fases: uma fase inicial de cerca de um mês e meio em que me foi explicado o funcionamento da farmácia, a divisão de tarefas e em que colaborei no aprovisionamento, armazenamento e gestão de *stocks*. Uma segunda fase de cerca de duas semanas em que assisti ao atendimento de vários elementos da equipa para me aperceber da forma como comunicar com os utentes e dos passos que eram necessários realizar no sistema informático e com o *software* SIFARMA2000®. Uma terceira fase de cerca de dois meses e meio em que contactei diretamente com os utentes, dispensei medicamentos e outros produtos, prestei aconselhamento farmacêutico e realizei medições de pressão arterial e de parâmetros bioquímicos.

Este relatório vai assumir a forma de análise SWOT (do inglês: *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), uma ferramenta de análise que permite identificar os pontos fortes e fracos, as oportunidades e as ameaças, havendo recolha de informação de um determinado ambiente e posterior distinção entre as questões internas (Forças e Fraquezas) e externas (Oportunidades e Ameaças).

Transpondo para o estágio em farmácia comunitária, a análise SWOT vai ser aplicada às circunstâncias que foram surgindo havendo uma avaliação da transição do conhecimento teórico para o domínio da prática profissional.

ENQUADRAMENTO GERAL

A Farmácia Coimbra encontra-se localizada no Centro Comercial CoimbraShopping, situado na Av. Dr. Mendes Silva, em Coimbra.

Estando enquadrada num centro comercial que se encontra inserido numa grande zona habitacional e escolar e relativamente próxima do Centro de Saúde Norton de Matos e da Unidade de Saúde Familiar (USF) Briosa, a Farmácia Coimbra apresenta uma localização privilegiada contando com grande afluência de utentes de variados contextos e com diversificadas necessidades.

Esta afluência é, em parte, também justificada pelo horário de funcionamento alargado (de segunda a quinta-feira, das 9h às 23h; sextas, sábados e vésperas de feriado das 9h às 24h e até às 22h nos Domingos e feriados). Não obstante, realiza periodicamente serviço permanente, permitindo uma resposta permanente durante 24h a qualquer situação de emergência, de acordo com o descrito no Decreto-Lei n.º 7/2011, de 10 de janeiro.

A Farmácia Coimbra pertence ao grupo de farmácias “Walk on by” e contempla uma equipa jovem, dinâmica e versátil. Conta com onze profissionais, cabendo a responsabilidade da direção técnica à Dra. Ana Leite e Silva (Tabela I).

Tabela I - Equipa da Farmácia Coimbra

PROFISSIONAL	FUNÇÃO
Dra. Ana Leite e Silva	Diretora Técnica
Dra. Catarina Pereira	Farmacêutica Adjunta
Dra. Diana Ferreira	Farmacêutica Substituta
Dra. Judite Pinto	Farmacêutica
Dra. Sofia Gonçalves	Farmacêutica
Dr. André Salvador	Farmacêutico
Dra. Inês Ramos	Farmacêutica
Cristiano Matos	Técnico de Farmácia
Anabela Lopes	Técnica de Farmácia
Mariana Couras	Técnica de Farmácia
Débora Marques	Técnica Auxiliar de Farmácia

No que concerne à sua infraestrutura, a farmácia está disposta de acordo com a legislação em vigor e é constituída por dois pisos.

No piso térreo encontramos a porta de emergência com postigo para os dias de serviço permanente (I), Os medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) são visíveis pelo utente mas encontram-se fora do alcance (J), a sala de atendimento ao público (A), com cinco balcões de atendimento (K), um gabinete de consulta (C), um escritório de direção técnica (B), um laboratório de manipulação de medicamentos, devidamente equipado, satisfazendo o mínimo obrigatório estipulado na Deliberação n.º 1500/2004, 7 de dezembro (E), uma zona de receção e gestão de encomendas (F) e instalações sanitárias (D), de uso exclusivo à equipa de trabalho.

No piso superior encontramos outra área destinada à receção e gestão de encomendas (G) sendo neste que se encontra instalado o robô (H). Existe ainda um espaço de armazém, fora das instalações da farmácia, onde ficam armazenados produtos de cosmética ou outros MNSRM em excesso, que vão sendo repostos sempre que necessário. É aqui também que se dispõem os produtos associados a devoluções ou quebras (Figura I).

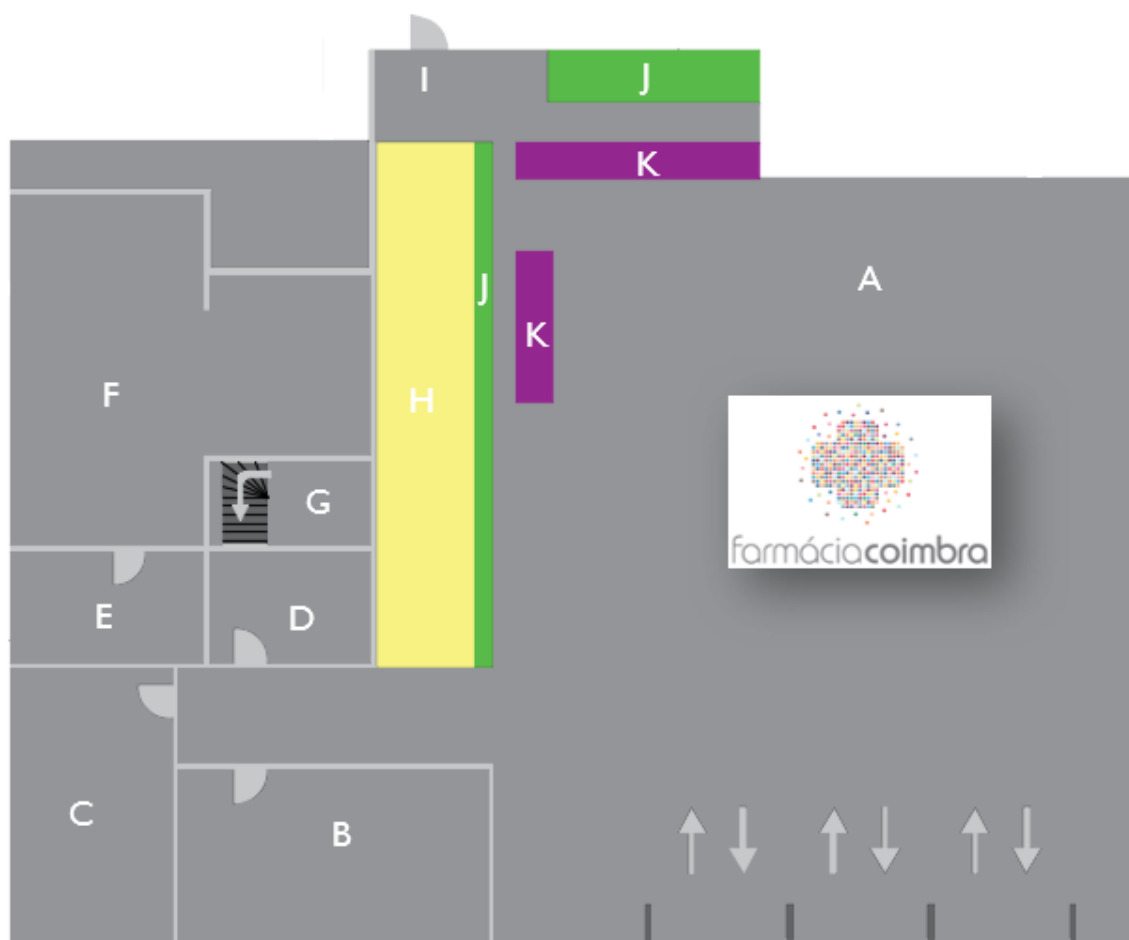


Figura I - As infraestruturas da Farmácia Coimbra

Deve ser realçado que há reposição periódica de produtos nas diversas zonas, assim como adaptação do espaço de acordo com as diferentes épocas sazonais e a perceção das necessidades dos utentes. É ainda de salientar que se verifica o cumprimento dos requisitos

relativo ao regime jurídico das farmácias de oficina, contemplados no Decreto-Lei n.º 171/2012, de 1 de agosto, assim como o respeito pelas áreas mínimas estipuladas na Deliberação n.º 2473/2007, de 28 de novembro.

Por último, é importante referir que, para além da dispensa de medicamentos, a Farmácia Coimbra possui ainda uma ampla oferta de artigos de cosmética, puericultura e veterinária e fornece serviços de medição de parâmetros fisiológicos e bioquímicos (nomeadamente medição da pressão arterial, peso, glicémia, colesterol total), cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC) e ainda consulta de nutrição. Participa também na recolha de medicamentos fora de uso em colaboração com a VALORMED.

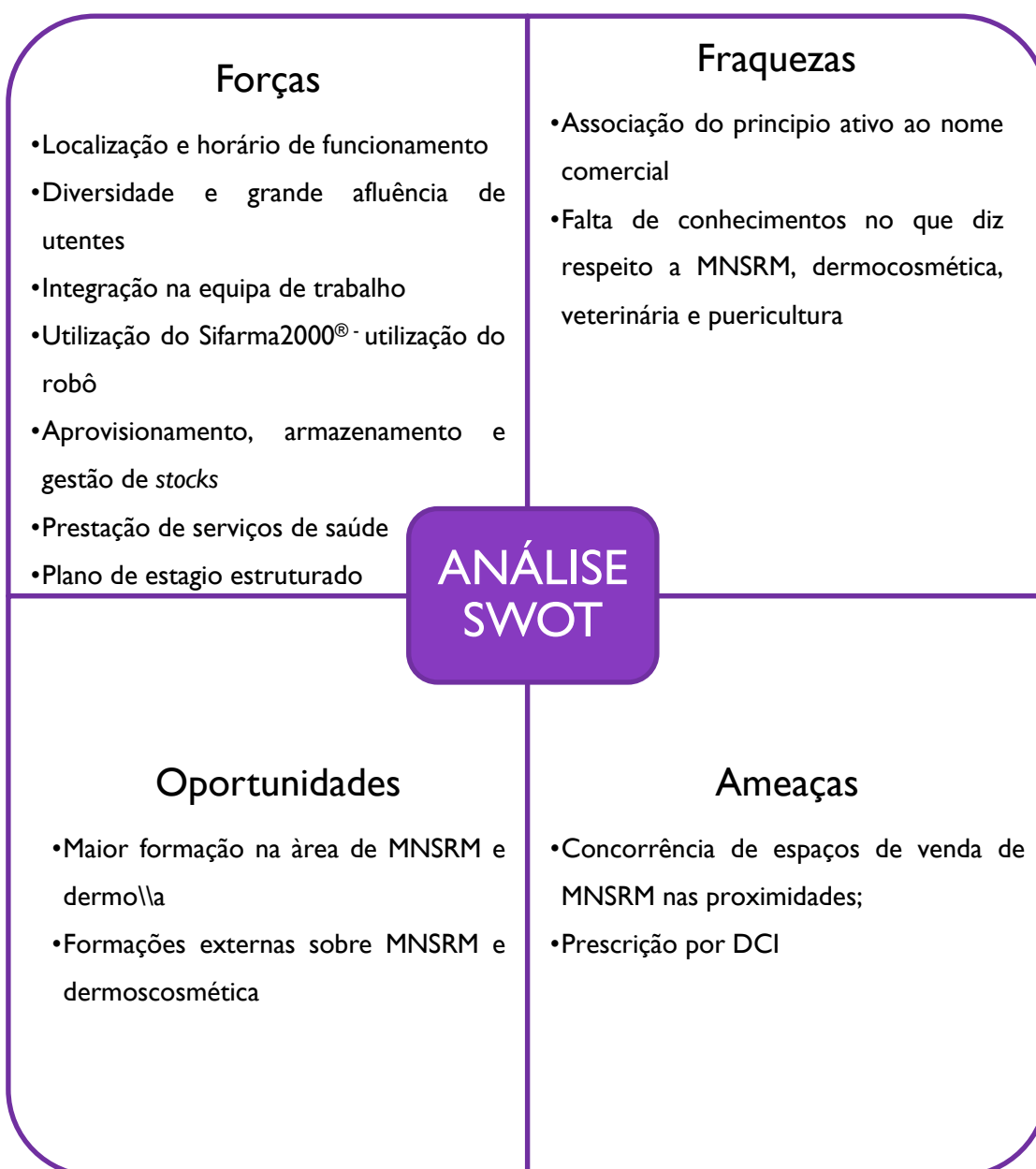
ANÁLISE SWOT

Uma análise SWOT é uma ferramenta de gestão muito utilizada nas empresas, permitindo efetuar a síntese da observação de um determinado objeto de estudo. É caracterizada pela identificação e descrição dos elementos chave de modo a estabelecer prioridades de ação e propor opções estratégicas.

Uma análise SWOT contempla duas dimensões: a interna – forças (*Strengths*) e fraquezas (*Weaknesses*); e externa – oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*).

Neste presente relatório, aplicarei esta ferramenta de gestão como crítica ao estágio que realizei e ao funcionamento da farmácia comunitária tendo em conta o que presenciei e aprendi durante esta etapa final do ciclo de estudos do MICEF.

Diagrama Síntese da Análise SWOT



FORÇAS

- **Localização e horário de funcionamento**

A Farmácia Coimbra situa-se no centro comercial “CoimbraShopping” desde 2011 e pertence a um grupo de farmácias denominado “Walk on by”. Este centro comercial está situado numa zona residencial, próximo de escolas, instituições de ensino superior, restaurantes, correios, centro de saúde, lojas, laboratórios de análises clínicas e outras farmácias. O acesso ao centro comercial é fácil e possui um amplo parque de estacionamento, o que promove uma boa adesão dos utentes.

A farmácia está aberta todos os dias, de segunda a quinta-feira das 9h às 23h, sexta, sábado e vésperas de feriados das 9h às 00h e domingo e feriados das 9h às 22h. Também realiza serviço permanente, quando definido.

- **Diversidade e grande afluência de utentes**

A localização da farmácia faz com que o público seja muito diversificado, com pessoas de diferentes faixas etárias, com diferentes graus de instrução, capacidades socioeconómicas diferentes e diferentes culturas o que traz grandes desafios.

Esta heterogeneidade populacional foi um dos pontos mais desafiantes do meu estágio e em simultâneo um ponto forte, uma vez que me permitiu desenvolver capacidades de comunicar com pessoas diferentes e aprender a melhor maneira de lidar com cada uma.

- **Integração na equipa de trabalho**

A equipa da farmácia é constituída por onze elementos, com uma divisão de tarefas bem definida, sendo que cada um sabe qual a sua responsabilidade e papel perante a equipa, permitindo assim um bom funcionamento da farmácia.

A integração na equipa de trabalho foi fácil, dado que há uma grande receptividade por parte de todos. A equipa apresenta um bom relacionamento entre si, com os utentes e com os estagiários. Sempre que precisei esclareceram-me, procuraram dar-me bases para as diversas situações com que me ia deparar, ensinaram-me a comunicar com os utentes e acima de tudo ensinaram-me a lidar com os meus erros, a saber assumi-los e tornar-me um melhor profissional.

- **Sistema informático – Sifarma 2000® - Equipamento – Robô**

A farmácia Coimbra tem instalado em todos os seus computadores o programa Sifarma 2000®. Este programa permite realizar diversas tarefas, nomeadamente realização e receção de encomendas, devoluções, gestão de *stocks*, controlo de psicotrópicos e benzodiazepinas e toda a informação relativa ao receituário e faturação. O programa permite ainda criar fichas de utente, onde fica guardada informação relativa à sua terapêutica e patologias, assim como as suas reservas, notas de crédito ou de débito. Esta ficha permite um melhor atendimento ao utente, nomeadamente no caso dos medicamentos genéricos, em que através da consulta da

ficha é possível dispensar o laboratório que o utente tem como preferencial para si, reduzindo possíveis trocas e devoluções de medicação, principalmente nos doentes idosos. Para além deste sistema a farmácia Coimbra dispõe de um cartão de pontos, associado à ficha do utente, que concede alguns descontos. Este é um ponto forte pois permite a fidelização de um maior número de utentes.

Para além disso, o Sifarma 2000[®] representa uma fonte de informação científica atualizada, sobre os medicamentos e produtos de saúde, permitindo o esclarecimento de dúvidas que surgem durante um atendimento.

A farmácia Coimbra está equipada com um robô, que permite uma automatização dos processos, nomeadamente de armazenamento e dispensa de medicamentos. O robô Rowa Vmax tem a capacidade de armazenamento de 9000 caixas, num espaço mais pequeno do que se os medicamentos fossem armazenados em gavetas ou armários. O robô está interligado com o Sifarma 2000[®], assim, quando damos entrada de uma encomenda pelo robô, fica registado o *stock* no sistema, o que permite uma melhor gestão de existências.

Desde o início do estágio que tive oportunidade de contactar de perto com o robô, procedendo à entrada de encomendas e à reposição de medicamentos. O robô possui um leitor de código de barras e é assim que reconhece o medicamento que está a ser inserido na esteira, para além de fazer a medição da embalagem secundária do mesmo de forma a validar o código de barras que corresponde àquele medicamento, além de conseguir perceber qual o local onde este poderá ser armazenado ou se possui espaço suficiente para o armazenar. O robô armazena os medicamentos de acordo com o tamanho da embalagem e do prazo de validade. Para isso quando se dá entrada no robô é necessário colocar o prazo de validade do medicamento no computador, se esta for mais curta do que aquela que está predefinida por este (1 ano após a data atual, com atualização mensal desta). Quando o robô dispensa os medicamentos, tem em atenção o prazo de validade, dispensando sempre em primeiro lugar o medicamento com o menor prazo de validade. Para além destas vantagens, a existência do robô permite também um melhor atendimento por parte do farmacêutico, uma vez que tem uma maior possibilidade de conversar com o utente, por não precisar de andar à procura do medicamento. Outra vantagem é que diminui o número de erros, pois como o medicamento é dispensado através da leitura do código de barras da receita, não são dispensados medicamentos com nomes, dosagens e embalagens parecidas por engano.

- **Aprovisionamento, armazenamento e gestão de stocks**

O farmacêutico da Farmácia Comunitária não tem apenas como função o atendimento ao público e a cedência de medicamentos. Apesar de esta ser a mais visível ao público em geral e onde se podem aplicar mais conhecimentos, não é apenas deste tipo de atividade que é feito o dia a dia de um farmacêutico. As atividades de “*back office*” vão desde o aprovisionamento e gestão de *stocks* à conferência de receituário e faturação. No início do meu estágio comecei por realizar atividades de “*back office*”, que permitem, por um lado, preparar-nos para a fase seguinte, que é o atendimento, mas também faz com que nos apercebamos do quão importante e árduo é a gestão de uma farmácia e o que está na base da sustentabilidade da mesma, sendo fundamental esta etapa de formação.

As encomendas podem ser feitas diretamente aos laboratórios ou através de armazenistas/cooperativas, sendo que na Farmácia Coimbra os principais fornecedores são a Alliance Healthcare, Empifarma e OCP.

As encomendas diretas aos laboratórios são feitas através de delegados comerciais e tornam-se vantajosas a nível de preço e bonificações. Estas implicam a aquisição de uma maior quantidade de produtos e uma entrega mais demorada.

Relativamente às encomendas efetuadas através de armazenistas/cooperativas, possibilitam a aquisição de produtos em pequenas quantidades e a encomenda pode ser feita via telefónica ou instantaneamente através do Sifarma2000®.

No caso da Farmácia Coimbra, as encomendas feitas diretamente aos laboratórios são feitas a nível central para todas as farmácias do grupo e a Diretora Técnica é responsável pelas encomendas diárias. Estas baseiam-se num sistema de gestão de *stocks* onde é necessário estabelecer um *stock* mínimo e máximo para cada produto de acordo com a análise de alguns fatores como, por exemplo, a sua rotatividade, a procura por parte do utente, o direcionamento das prescrições médicas e a existência de bonificações, conseguindo assim satisfazer as necessidades diárias da farmácia. No sistema informático também é possível obter informações acerca da venda mensal de cada produto, o que pode auxiliar neste tipo de encomendas.

O rececionamento de encomendas foi das primeiras tarefas que me foi destinada enquanto estagiário. Os produtos são entregues pelo fornecedor, devidamente acondicionados e acompanhados das respetivas faturas de cada encomenda em duplicado. A primeira coisa que é feita quando estas chegam é verificar se há produtos termolábeis que necessitem de ser logo conferidos e arrumados no frigorífico. Depois, procede-se à receção através do Sifarma2000®,

verificação de quantidades e faturação enviada com posterior armazenamento das encomendas, no robô ou nas respetivas prateleiras e gavetas.

Quanto ao controlo dos prazos de validade, é uma atividade bastante importante para garantir que todos os produtos chegam ao utente mantendo a sua qualidade, eficácia e segurança mas também para minimizar os gastos da farmácia face aos produtos cujos prazos de validade estejam a expirar.

No momento da receção de encomendas, é sempre inserido no sistema informático o prazo de validade dos produtos, possibilitando assim o seu posterior controlo. Todos os meses, através do Sifarma2000[®], é impressa uma lista contendo os produtos cuja data de validade expira nos próximos 3 meses. Esses produtos são posteriormente devolvidos aos fornecedores.

Todos os produtos que são devolvidos aos fornecedores têm de ser acompanhados por uma nota de devolução do produto, onde consta sempre a identificação da farmácia, do fornecedor, do produto e a devida justificação da devolução, que pode envolver a aproximação do final do prazo de validade, danificação do produto, produtos que são enviados por engano ou retirados do mercado pelo INFARMED.

- **Prestação de serviços de saúde**

Ao longo dos anos a farmácia comunitária tem vindo a ganhar um papel muito importante para a promoção da saúde na sociedade, através de diferentes cuidados de saúde e não só através da dispensa de medicamentos.

A farmácia Coimbra dispõe de diversos serviços essenciais, que são uma mais valia para promover o bem-estar dos utentes. Fazem parte do leque destes serviços, a medição da pressão arterial, da glicémia, do colesterol e do peso corporal.

A medição destes parâmetros foi essencial para estabelecer um contacto mais próximo com os utentes da farmácia, para aprender a ouvir as pessoas e prestar conselhos perante os resultados. A medição destes parâmetros é importante, permitindo o controlo ou a deteção de muitas patologias que afetam cada vez mais a população em geral.

- **Plano de estágio estruturado**

A farmácia comunitária engloba uma série de tarefas diferentes, e é fulcral que o estagiário ganhe aptidão para as desempenhar ao longo do estágio. Na Farmácia Coimbra, o estagiário

começa por trabalhar no “*back office*”, dando entrada de encomendas e armazenando as existências, bem como ajudando na organização de lineares. A focalização inicial neste trabalho permite ao estagiário associar o nome da marca ao medicamento e ficar a conhecer a localização dos medicamentos na farmácia, facilitando posteriormente o atendimento aos utentes. Estas tarefas iniciam também o estagiário na utilização do Sifarma2000®. De seguida o estagiário passa a assistir a atendimentos realizados pela equipa da farmácia e aprende a conferir receitas, de forma a preparar-se para atender ao balcão. Nos primeiros tempos de atendimento ao balcão, o estagiário é supervisionado por um farmacêutico, até que ganhe autonomia para poder atender sem supervisão, mas sempre podendo contar com o apoio da equipa para qualquer dúvida que surja no decorrer da sua atividade. Este método de estruturação do estágio permite que o estagiário se adapte ao dia-a-dia de uma farmácia com maior facilidade, bem como reduzindo o número de erros que o mesmo possa cometer.

FRAQUEZAS

- **Associação do princípio ativo ao nome comercial**

A capacidade de associação do princípio ativo ao nome comercial do medicamento tem que estar sempre presente no ato da dispensa de medicamentos. Isto revelou-se para mim um ponto fraco quando iniciei o atendimento ao balcão, uma vez que os utentes referem-se na maior parte das vezes ao medicamento pelo seu nome comercial e não pelo princípio ativo, o que por vezes se torna difícil de correlacionar. O tempo de estágio dedicado ao “**back office**” foi sem dúvida uma grande oportunidade de colmatar este ponto, devido ao constante contacto com as embalagens dos medicamentos e, com a prática do atendimento, esta dificuldade de associação foi sendo ultrapassada.

- **Conhecimento insuficiente de MNSRM**

Ainda referente ao que foi aprendido durante o curso senti, inicialmente, alguma dificuldade no aconselhamento de alguns MNSRM. Considero que, apesar de ser importante o conhecimento dos grupos farmacológicos, mecanismos de ação, funções e interações dos MNSRM, temos poucos conhecimentos relativos aos MNSRM.

Devemos estar cientes, da realidade crescente que é a automedicação. Esta surge com o aumento de informação e com a publicidade na televisão e internet.

Sendo que não podemos alterar a terapêutica prescrita pelo médico, devíamos ser detentores de um mais aprofundado conhecimento para o aconselhamento dos MNSRM dado que, muitas vezes, os doentes recorrem primeiramente às farmácias de modo a evitar filas, tempo de espera e taxa de consulta no médico, não menosprezando os conhecimentos que devemos ter de modo a encaminhar o doente de volta ao médico para a possível revisão terapêutica.

OPORTUNIDADES

- **Maior formação na área de MNSRM e dermocosmética**

Como uma oportunidade de enquanto aluno estar mais preparado para o trabalho numa farmácia comunitária, acho de suma importância que o conhecimento sobre este tipo de produtos seja mais ampliado e aprofundado, visto que ainda continua a ser reduzido para o que enfrentamos diariamente na farmácia, reduzindo a nossa capacidade de aconselhar e expondo fragilidades que temos enquanto estagiários e futuros profissionais.

- **Formações externas sobre MNSRM e dermocosmética**

As formações que pude assistir enquanto estagiário foram sem dúvida uma mais valia para o meu conhecimento neste tipo de produtos dado que permite além de dar a conhecer os produtos já existentes ou novos, fazer uma constante atualização de conhecimento acerca dos mesmos, permitindo colmatar em parte a falta de conhecimento que tinha enquanto aluno, sendo apenas de lamentar a pequena quantidade de formações a que pude assistir, não por indisponibilidade da farmácia, mas por restrições do meu próprio horário enquanto trabalhador-estudante.

AMEAÇAS

- **Concorrência de espaços de venda de MNSRM nas proximidades**

O acesso aos medicamentos e produtos de saúde, normalmente disponibilizados pela farmácia, encontra-se cada vez mais facilitado, principalmente através das grandes superfícies comerciais e parafarmácias que atualmente estão autorizadas a vender MNSRM ao público.

Para além de poder ser interpretado como uma ameaça económica, este tipo de superfícies comerciais podem constituir um risco para a saúde pública uma vez que a formação científica

dos profissionais destes estabelecimentos é insuficiente, levando a um aconselhamento fraco e algumas vezes erróneo.

Reportando para o meu estágio, há que salientar que à frente das instalações da farmácia encontramos um hipermercado que inclui uma parafarmácia. Assim, por vezes deparávamo-nos com utentes que tinham ficado com dúvidas ou ideias erradas sobre a posologia e modo de administração, que tinham sido transmitidas nesse estabelecimento e ficavam desconfiados quando lhes era apresentado um aconselhamento diferente.

- **Prescrição por DCI (denominação comum internacional)**

A prescrição por DCI torna-se uma ameaça, pois ao longo do estágio dei-me conta que os utentes não entendem ainda que uma mesma substância ativa pode ser comercializada na forma de várias marcas e genéricos. Embora os medicamentos genéricos já existam há algum tempo e estejam amplamente divulgados, como já referi os utentes ainda apresentam uma elevada desconfiança em relação a estes medicamentos e, isto, é sentido durante o atendimento. Os utentes apresentam muitas vezes receio em escolher estes medicamentos, acabando por o fazer muitas vezes por questões monetárias.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Farmácia Comunitária é, sem dúvida, um local de aprendizagem constante, onde todos os dias se avizinha um novo desafio, uma situação totalmente diferente do já experienciado, estimulando-nos a adquirir novos saberes e a manter as capacidades científicas e técnicas atualizadas.

O estágio é a oportunidade de colocar em prática os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do curso. Este estágio representou um grande desafio para mim, pois apesar de gostar de contatar com pessoas, fazê-lo enquanto profissional de saúde acarreta uma grande responsabilidade.

Este relatório pretendeu relatar de forma crítica as experiências vividas ao longo do estágio, os conhecimentos adquiridos e as tarefas que tive oportunidade de realizar. O fato de ter realizado o estágio na Farmácia Coimbra representou uma mais-valia devido à elevada heterogeneidade e fluxo de utentes que apresenta, permitindo-me cada dia contatar com novas situações, novos casos, novos aconselhamentos, ou seja, mais conhecimento.

Tive oportunidade de crescer enquanto futuro farmacêutico, mas também enquanto pessoa e perceber que o farmacêutico não é apenas um dispensador de medicamentos, tendo um papel relevante na promoção da saúde dos utentes, através dos cuidados e dos serviços que presta na farmácia.

Terminado o estágio, sinto-me concretizado por observar que assimilei vários conhecimentos durante o percurso académico que foram de extrema importância e utilidade para o meu desenvolvimento como profissional e, conjuntamente com o estágio, torno-me apto para enfrentar o mercado de trabalho, não só como um profissional de dispensa de produtos, mas como um especialista do medicamento e agente de saúde pública, que preza pelo bem-estar geral da sociedade em que se insere, promovendo a saúde.

Capítulo III

Monografia

“Células CAR-NK - Nova proposta terapêutica em oncologia”

Professor Doutor João Nuno Moreira

Daniel da Silva Gonçalves | Estágio curricular | 2019

Abreviaturas

ADCC – *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*

CAR – *Chimeric Antigen Receptor*

Cas-9 – *Caspase 9*

CD – *Cluster of differentiation*

CRISPR – *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

GMP – *Good manufacturing practices*

HLA – *Antigénio leucocitário humano*

IFN- γ – *Interferon-gamma*

IL – *Interleukin*

iPSC's – *induced Pluripotent Stem Cells*

KIR – *Killer-cell immunoglobulin-like receptors*

LLA – *Leucemia linfoblástica aguda*

mRNA – *messenger RNA*

NCR – *Natural cytotoxicity receptors*

NK – *Natural Killer*

NKG2A – *C-type lectin receptors*

NKG2D – *C-type lectin receptors*

TCR – *T-cell receptor*

TNF- α – *Tumor necrosis factor- α*

Resumo

A área da oncologia é e continuará a ser uma das que mais expansão continua a ter na ciência. É também nesta que se vão fazendo mais esforços e mais descobertas para que possam ser tratadas patologias deste tipo, de forma cada vez mais eficaz e com maior segurança e qualidade para os doentes. Assim, surgem as células CAR-NK em resposta a patologias oncológicas, como uma nova possibilidade de tratamento das mesmas. É sobre esta possibilidade que se debruça esta monografia e o objetivo da mesma. Estas células aliam a capacidade antitumoral das células NK, com o reconhecimento de células que não pertencem ao self da memória imunológica que o organismo possui, à introdução de recetores específicos para antigénios apresentados por células tumorais, para que desta forma possa ser feito um reconhecimento mais específico das mesmas e a sua conseqüente destruição. Desta forma, o tratamento será mais eficaz na medida em que será mais específico e dirigido apenas às células tumorais e não às células saudáveis, bem como com um grau de efeitos adversos muito mais reduzido ou quase inexistente. Contudo, a produção e aplicação deste tipo de tratamento celular apresenta ainda alguns desafios. É necessário perceber tudo o que será necessário fornecer às células, e qual a melhor forma de estas serem administradas, se sozinhas ou em conjunto com citocinas ou outras moléculas anticancerígenas. Tudo isto para que o efeito obtido possa ser máximo e, como tal, a eficácia do tratamento também. Estas são algumas dificuldades que já foram previamente enfrentadas com a produção de células CAR-T. Quando em comparação, as células CAR-NK apresentam várias vantagens em relação às suas antecessoras no tratamento celular de cancro, pois estas, não estão dependentes de um reconhecimento pelo complexo major de histocompatibilidade, pelo que não existe o risco de uma rejeição ou desenvolvimento de GVHD. Isto leva à possibilidade, extremamente relevante, de estas células poderem ser produzidas de acordo com normas GMP, para que possam ser utilizadas num formato *off-the-shelf*, tal como já acontece com outro tipo de moléculas. Existem já vários ensaios clínicos em curso, para diversos tipos de cancro e com recetores CAR-NK diferentes e aplicados de forma diferente, para que se possam desenvolver variados tipos de células de forma a responder a uma maior variedade de patologias. Existem também produtos comercializados para utilização em doentes que deles necessitem, tal como as células FT596 da Fate Therapeutics.

No futuro, estas células poderão ser utilizadas para patologias infecciosas e até disfunções imunológicas que estão associadas a disfunções genéticas.

Palavras-chave: células NK; CAR-NK; oncologia; terapia celular; recetores CAR.

Abstract

The area of oncology is and will continue to be one of the most expanding areas in science. Efforts are being made and discoveries are being made to treat these diseases more effectively and with greater safety and security as well as quality for the patients who need them. Thus, CAR-NK cells appear in response to oncological pathologies as a new possibility of treatment. The objective of this monography is exactly to talk about this possibility. These cells combine the anti-tumor capacity of NK cells, with the recognition of non-self-cells with the introduction of antigen-specific receptors presented by tumor cells, which leads to a more specific recognition of them and their consequent destruction. Thus, the treatment will be more effective due to be more specific as it only affects tumor cells and not healthy cells. However, the production and application of this type of cellular treatment still presents some challenges because it is necessary to understand everything that will be needed to provide to the cells, as well as how they can be administered, as a single administration or in combination with cytokines or other anticancer molecules, so that the effect obtained may be maximum. These are some difficulties that have also been faced with the production of CAR-T cells. When compared, CAR-NK cells have several advantages over their predecessors in the cellular treatment of cancers because they are not dependent on recognition by the major histocompatibility complex, for example, so there is no risk of rejection or development of GVHD. This leads to the extremely relevant possibility that these cells can be produced according to GMP standards so that they can be used in an off-the-shelf format, as is the case of other molecules.

Several clinical trials are already underway for different types of cancer and with different and differently applied CAR-NK receptors, so that different cell types can be developed to respond to a wider variety of conditions. There are already products available for use in patients who need them, such as Fate Therapeutics FT596 cells.

In the future, these cells may be used for infectious conditions and even immune dysfunctions that are associated with cell malfunction or altered protein production, for example.

Keywords: NK cells; CAR-NK; oncology; celular therapy; CAR receptors.

I. Introdução

A oncologia é uma área científica que tem tido uma franca expansão ao longo dos anos, muito devido ao facto dos problemas oncológicos terem também um crescimento durante o mesmo período. Por outro lado, também cada vez mais se começam a compreender os mecanismos deste tipo de patologias e assim também surgem novas possibilidades de tratamento. É nesse campo que muitas novidades têm surgido e é também aqui que se insere o objeto de estudo desta monografia. Nesta monografia pretende-se falar acerca de uma nova possibilidade de terapia celular a nível oncológico, as células CAR-NK.

A terapia celular, não só é recente, como tem ainda uma vasta gama de possibilidades em aberto e que estão a ser exploradas pouco a pouco. Estas terapias apresentam uma grande vantagem e utilidade na terapia oncológica, uma vez que, conseguem ser mais dirigidas ao alvo de tratamento, evitando uma degradação de células normais, por exemplo. A grande dificuldade deste tipo de terapias prende-se com o facto de ser necessário obter células previamente, quer seja por cultura celular ou por obtenção a partir de doadores. Isto, de forma a que estas possam depois ser utilizadas no tratamento posterior, sofrendo ou não alterações da sua genética ou fenótipo. Nem todas as patologias oncológicas poderão ser candidatas a tratamentos celulares, sendo que tumores sólidos serão sempre difíceis de atingir com estas terapias pela dificuldade de acesso das células em circulação a estes mesmos tumores. Mas, nos casos elegíveis para este tipo de tratamento, esta terapia será uma nova esperança de tratamento e de eficácia, com possibilidade de garantia de eliminação da patologia de modo permanente.(1, 2)

I.1. CÉLULAS NK

O nosso sistema imunológico é composto por diversas células, cada uma delas com diferentes funções específicas, sendo todas elas essenciais para o bom funcionamento do sistema imunitário e do combate a patologias infecciosas, ou não. Assim, as representantes mais importantes deste sistema são os leucócitos, divididos também eles em diversos tipos de células como os neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos, monócitos, células dendríticas, entre outras. Dentro destas, destacar os linfócitos, que são responsáveis por imunidade celular e humoral, estando divididos em diferentes famílias. Os linfócitos B são os principais responsáveis pela nossa imunidade humoral, uma vez que, são estes que após a transformação em plasmócitos, produzem as imunoglobulinas responsáveis por identificarem e ajudarem no

combate a microrganismos ou células infetadas. Os linfócitos T são os principais responsáveis pela imunidade celular, existindo populações diferentes dos mesmos, como os T helper ou os T citotóxicos ou ainda as células T reguladoras. Estas células participam na apresentação de antígenos a outras células de forma a potenciar a resposta das mesmas e ainda produzem citocinas que vão incrementar a resposta imunológica. Relacionadas com as células T citotóxicas, existem também as células NK, ou natural killers.(1) Esta população de células não é abundante no nosso organismo, existindo apenas em número suficiente para que as infeções e alterações celulares possam ser mantidas sob controlo. Uma grande quantidade destas células não seria benéfica, muito pelo contrário, pois haveria o risco de ocorrerem muitas reações cruzadas e reconhecimentos enganosos, levando à destruição de células perfeitamente saudáveis. As células NK são caracterizadas por possuírem uma falta de CD3/TCR mas com presença de CD16 e CD56. Existe ainda uma divisão entre as células NK em subpopulações, sendo classificadas fenotipicamente através de citometria de fluxo em células CD56dim (ricas em CD16) e CD56bright (pobres em CD16).(1-6)

As células NK são responsáveis pelo combate a células infetadas ou tumorais sem que tenham sido apresentadas a nenhuma das alterações primariamente, ou seja, não dependem de memória imunológica para que exerçam a sua atuação. Isto acontece devido ao facto de estas reconhecerem a existência ou não de moléculas HLA (antígeno leucocitário humano) à superfície das células.(2, 4) Assim, há um reconhecimento do self, pois, células que estejam infetadas ou sejam de origem maligna não apresentam este tipo de moléculas na sua superfície e desencadeiam uma resposta por parte das células NK, uma vez que não há inibição da sua atuação por ligação aos recetores tipo Ig killer (KIR) ou recetores heterodiméricos tipo lectina-C (NKG2A). Mas, para além de recetores inibitórios estas células também possuem recetores de atuação, os recetores de citotoxicidade natural (NCR) ou recetores ativadores tipo lectina-C (NKG2D). As células NK podem exercer a sua citotoxicidade com desgranulação de moléculas como a perforina e granzima, por libertação de citocinas como o IFN- γ ou TNF- α , através de um mecanismo de ADCC (citotoxicidade mediada por anticorpos), ou ainda por modificações genéticas através de tecnologias CAR (Chimeric Antigen Receptor). Estes diferentes mecanismos encontram-se esquematizados na Figura 1.

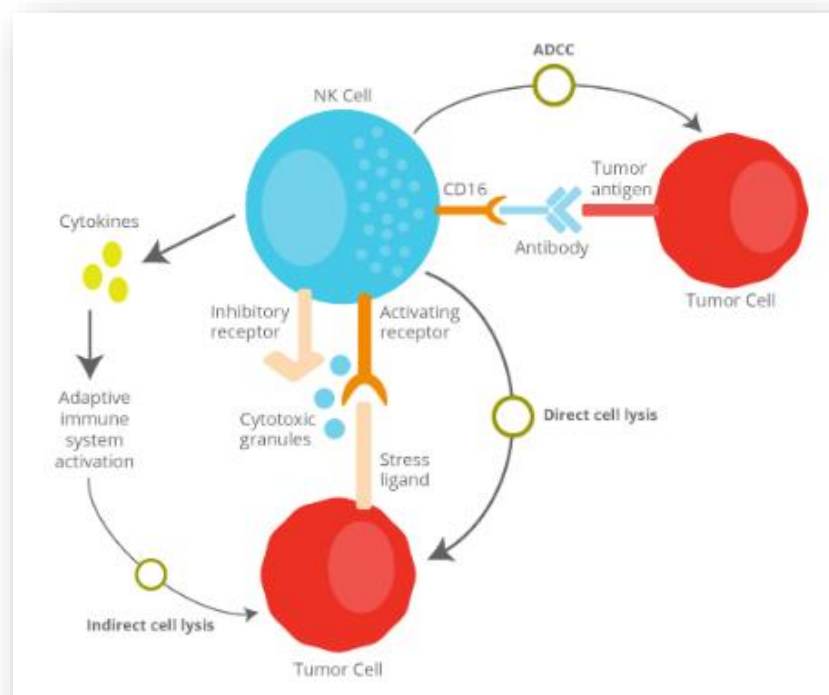


Figura 1 – Mecanismo de ação das células NK (adaptado de "<https://fatetherapeutics.com/pipeline/immuno-oncology-candidates/nk100/>")

Após reconhecimento de células não-self, as células NK vão promover a destruição da célula identificada, provocando a lise celular ou apoptose da mesma.(1)

Estas células são uma ferramenta fundamental do organismo na defesa contra, nomeadamente, células cancerígenas, visto que este tipo de células vai expressar à sua superfície diferentes antígenos em relação às células normais, ficando assim expostas à identificação por parte das células NK. Assim sendo, estas células são cruciais para evitar o surgimento de patologias oncológicas, entre outras.(1, 2)

1.2. CÉLULAS CAR-NK

O acrónimo CAR significa Chimeric Antigen Receptor, ou seja, estas células têm um recetor de antígenos modificado por engenharia genética, para que possa reconhecer um antígeno em específico do nosso desejo. É possível retirar proveito das funções inerentes a estas células para conseguir tratamento contra outro tipo de células, que serão patológicas como é o caso de cancro da mama, glioblastomas ou outros. Este novo recetor apresentado por estas células (CAR-T ou CAR-NK) vai atuar de forma exatamente igual aos que esta possuía anteriormente, ou seja, irá realizar o reconhecimento de antígenos específicos por ligação aos mesmos. Desta

forma, não é necessário haver eliminação dos recetores que previamente existiam na célula.(1, 3, 6) Este tipo de recetor designa-se por quimérico pois, ele é constituído por uma porção extracelular que se liga ao antígeno alvo, derivado de um anticorpo monoclonal, bem como por uma porção intracelular que normalmente faz parte da porção CD3 presente no TCR (T-cell receptor) dos linfócitos T, tal como se pretende demonstrar com a Figura 2. As células NK que poderão ser utilizadas com este propósito podem ser de origem autóloga, heteróloga, obtidas através de células de cordão umbilical ou células pluripotentes do adulto. Alternativamente podem ainda ser criadas através de linhagens já estudadas, conhecidas e imortais. Existe a possibilidade de diferentes linhagens poderem ser utilizadas com maior benefício ou vantagem em relação às que podem ser obtidas do cordão umbilical ou que sejam induzidas.(1, 4, 6-8) Estas células têm de ser obtidas por processos de cultura celular, havendo um crescimento prévio das mesmas em condições apropriadas, para que depois possam ser introduzidas as alterações desejadas e só depois estas possam ser utilizadas em terapia. Existem diversas linhagens celulares que poderão ser utilizadas, no entanto as mais comuns e mais conhecidas em relação à tecnologia CAR são as NK-92, células estas que, primariamente foram colhidas de um doente com linfoma não-Hodgkin.(1, 7, 9-11)

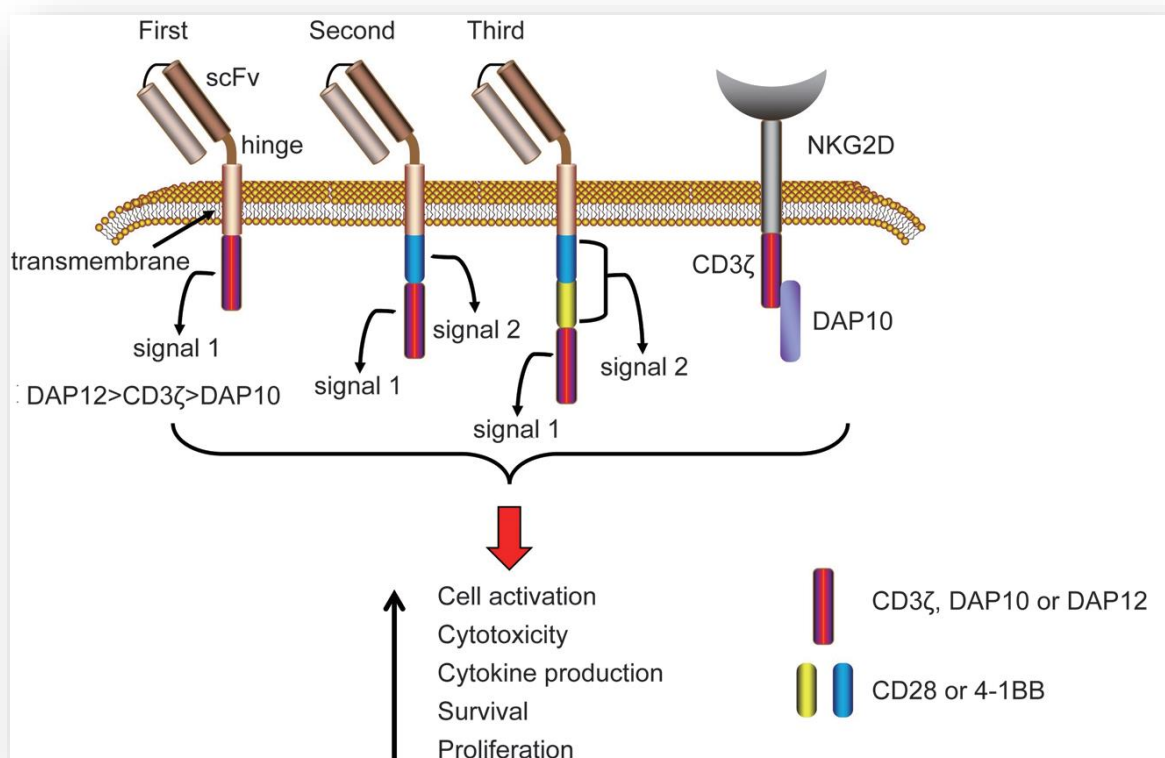


Figura 2 – Estrutura de recetores CAR na superfície celular (Adaptado de "Chimeric antigen receptor (CAR)-transduced natural killer cells in tumor immunotherapy") (3)

2. CAR – Desenvolvimento

2.1. TECNOLOGIA CAR E SEU DESENVOLVIMENTO

A tecnologia CAR já existe há algum tempo, mas até aos dias de hoje só está bem estabelecida para as células T. Nestas células já existem diversos estudos clínicos com resultados promissores e positivos em diversos tipos de tumores, sendo que as células utilizadas são sempre autólogas devido à especificidade das mesmas e à problemática de estas poderem causar GVHD. As patologias com maior estudo na utilização desta terapia são as leucemias linfóides e os linfomas, sendo que o maior sucesso foi obtido na utilização deste tipo de células na leucemia linfoblástica aguda (LLA), apenas com uma injeção de células seguida de sessões de quimioterapia para reduzir a proliferação de linfócitos.(1, 9, 10, 12)

Esta tecnologia surge da necessidade de melhorar o combate que o nosso próprio organismo é capaz de fazer contra células tumorais. Os tumores possuem um crescimento completamente distinto das restantes células do nosso organismo, sendo que possuem também diversos mecanismos de escape à vigilância do nosso sistema imunitário. Um desses mecanismos é a expressão de antígenos à superfície celular que mimetizam antígenos de células saudáveis do nosso organismo, mais concretamente do tecido em que se encontram instaladas. Outro mecanismo de fuga acenta na diminuição do número de antígenos que são expressos à superfície celular para que mais dificilmente sejam detetadas pelo sistema imunitário e reconhecidas como não-self. Desta forma, a tecnologia CAR surge como um aumento na capacidade de reconhecimento destes antígenos tumorais, para que um maior número destas células possa ser reconhecido e eliminado, dotando as células de maior especificidade no combate a estas patologias e maior eficiência. A solução encontrada baseia-se numa modificação genética que vai ser induzida nas células T ou NK, com a introdução de novos recetores quiméricos à superfície da membrana das mesmas, como já foi descrito anteriormente.

Esta adição deste tipo de recetores pode ser feita por várias formas. Uma das mais simples a utilizar será a eletroporação, com introdução direta de moléculas de mRNA, surgindo a presença destes recetores de forma quase imediata à superfície da célula.(3, 13) Uma outra alternativa é a nucleofecção que combina a técnica anterior com agentes promotores de nucleofecção.(3, 13) Podem ainda ser utilizados vetores virais para que se consiga fazer a introdução de fragmentos de DNA nas células alvo, como os lentivírus ou os retrovírus.(13) Finalmente, as células podem ser reprogramadas com recurso a uma nova tecnologia, a CRISPR, na qual vai haver alteração ou introdução de pequenas partes de material genético na

cadeia de DNA da célula, sem que haja a possibilidade de estas se tornarem portadoras de um vírus, por exemplo.(3, 13) As primeiras duas técnicas mencionadas estão associadas a uma menor percentagem de células transfetadas, pelo que nem sempre são as melhores opções para serem utilizadas em larga escala se necessário.(12) Os vetores virais têm uma taxa de sucesso na transfeção muito superior mas trazem algumas questões que terão sempre de ser atendidas previamente a serem consideradas completamente seguras, visto que esta tecnologia não poderá ser utilizada em pessoas imunodeprimidas, pelo menos numa fase inicial das investigações. Apesar dos vírus utilizados não possuírem em teoria capacidade para infectar as células utilizadas e produzir novos viriões, estes poderão ser capazes de produzir alterações não específicas e mutagénicas nas células utilizadas, provocando uma resposta inapropriada das células na terapia, bem como uma replicação e criação de células com alterações tumorais elas próprias.(3, 12) Desta forma, as células poderão ter de ser irradiadas previamente à sua utilização, o que poderá pôr em causa a sua viabilidade e persistência nos doentes após a sua inoculação. Poderá ser necessário uma injeção de citocinas fundamentais para a boa manutenção das células NK, como a IL-15, o que por si só, traz mais uma preocupação devido à toxicidade destas moléculas quando em concentrações elevadas. Existem diversos fatores que irão influenciar o sucesso da eficácia e eficiência das células utilizadas, como se apresenta resumidamente na Figura 3. Mais recentemente, foram já estudadas possibilidades de utilizar células modificadas não só com CAR específico para antígenos tumorais, mas também contra moléculas que estão presentes no microambiente tumoral e contra moléculas que vão por si só estimular uma maior ativação e resposta das próprias células NK, com resultados positivos.(2, 3, 12, 13)

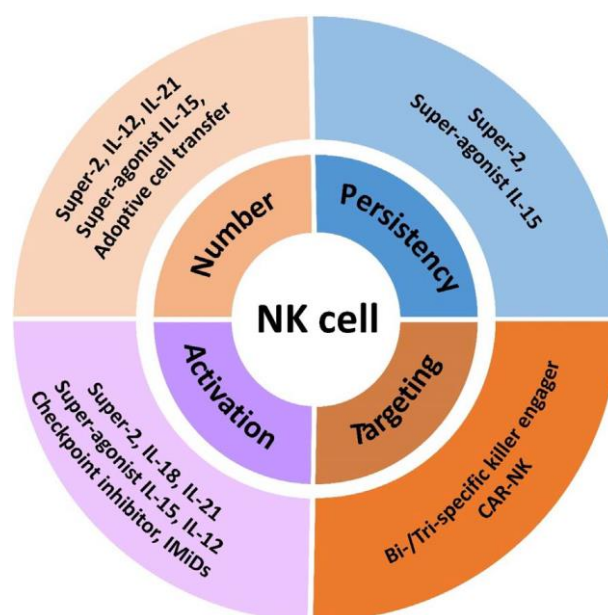


Figura 3 – Fatores que influenciam o bom desenvolvimento e funcionamento de células NK (Adaptado de "NK cell-based immunotherapy for cancer")(2)

As células CAR-NK são vantajosas no sentido em que, estas estão autolimitadas no tempo, ou seja, não têm capacidade de proliferar e manter a sua atividade durante longos períodos de tempo, pelo que não se colocam grandes riscos quanto à sua atividade excessiva ou off-target. Apesar disso é benéfico que estas mantenham a sua atividade durante o tempo necessário para a eliminação das células tumorais pelo que o balanço entre estas duas situações ainda se apresenta como um desafio. É preciso um equilíbrio entre o desenvolvimento de melhores métodos de manutenção da viabilidade das células modificadas no interior do organismo, contra a hipótese de ser colocado um gene de suicídio programado, e que pode ser controlado e despoletado quando necessário, tal como já foi testado com a introdução do gene de uma proteína pró-apoptótica como a Cas-9.(11, 13)

Após a obtenção das células reprogramadas estas podem ser utilizadas sendo postas em circulação no organismo, ou podem ser injetadas diretamente no tumor, funcionando como um tipo de vacina que vai permitir a redução do tamanho do tumor e idealmente a sua eliminação. Ainda não é sabido se apenas uma utilização de células deste género será suficiente para eliminar os diversos tumores que são propostos para este tipo de tratamento ou, se será necessário, tal como na terapia com células T, uma aplicação de quimioterapia após a atuação das células. Também, ainda está em estudo a necessidade de após uma injeção ser necessário introduzir moléculas para manter a sua viabilidade e eficiência, ou a necessidade de injetar diversas vezes para que o efeito da terapia seja superior.(11, 13)

2.2. OBTENÇÃO DE CÉLULAS NK

As células NK, como já foi referido, não são uma população muito abundante em circulação no nosso organismo, pelo que a obtenção direta destas por doação não está facilitada. Assim, se a forma escolhida para a sua obtenção for esta, esta terá de ser feita a partir de uma colheita de células do cordão umbilical, onde poderão ser colhidas células hematopoiéticas progenitoras, que após a sua incubação e desenvolvimento in vitro irão dar origem a células NK competentes e possíveis de reprogramar. Será necessária uma incubação das células colhidas para que possa haver um desenvolvimento e divisão celular de forma a aumentar a sua quantidade, e só depois proceder à sua alteração para CAR-NK. Também é possível fazer a colheita de células progenitoras do adulto, atravessando estas depois o mesmo processo referido anteriormente. A utilização de células pluripotentes induzidas humanas (iPSC's) também é uma boa aposta neste ramo, técnica já amplamente utilizada e com bons resultados.(3, 9, 11, 13)

Por outro lado, podem ser utilizadas linhagens celulares de células NK já existentes comercialmente para que se possam ser diretamente transformadas em células CAR-NK. Estas linhagens celulares têm vantagem em relação às restantes hipóteses visto que, normalmente, são linhagens celulares imortais e que existem em grande quantidade, ou seja, estão disponíveis para utilização *off-the-shelf* mais facilmente do que as resultantes dos outros processos. Existem diversas linhagens de células NK, tais como as NKG, YT, NK-YS, HANK-I, YTS ou ainda NKL. Contudo, as células NK-92 são atualmente as mais utilizadas e aplicadas com sucesso em estudos efetuados com recurso a estas mesmas células. Estas células têm um défice de recetores inibitórios (KIR) quase absoluto, exceção feita ao recetor KIR2DL4, o que pode ser o motivo para a sua grande atividade *in vitro* contra diversos tipos de tumor. Mas, após utilização das mesmas em alguns doentes, verificou-se que a atividade exercida por estas não era tão ideal como seria esperado, pelo que mais estudos sob formas de aumentar a sua atividade *in vivo* têm de ser efetuados.(1-3, 5, 9, 12-14)

2.3. PRODUÇÃO DE CÉLULAS CAR-NK

As células NK apenas correspondem a cerca de 5-15% de todos os linfócitos, pelo que a sua separação e posterior expansão é fundamental para que estas possam ser utilizadas em terapia celular. Apesar de ser ainda difícil conseguir métodos que sejam completamente concordantes com as GMP, já existe forma de conseguir resultados satisfatórios para a tecnologia CAR, processo este representado pela figura 4.(12, 13, 15)

Assim, é possível fazer a separação de células NK utilizando o equipamento CliniMACS, que vai fazer com que haja uma depleção de células CD3 positivas, seguido de um enriquecimento de células CD56 positivas. Após esta separação, estas células podem ser enriquecidas e promovida a sua proliferação com recurso à IL-2 e/ou com recurso a utilização de células mononucleares periféricas (PBMC), que irão atuar como fornecedoras de citocinas necessárias ao desenvolvimento e manutenção das células NK. É conveniente realizar uma nova depleção de células T previamente à junção de novas PBMC para que desta forma se evite um sobre crescimento de células T, e dessa forma fosse aumentado o risco de GVHD. A IL-2 vai ser responsável não só pelo desenvolvimento das células NK, mas também pela promoção da produção de citocinas por parte destas, bem como por, uma maior predominância de recetores NKG2D e NCR's. A IL-15 também parece conseguir resultados semelhantes com produção de grandes quantidades de NCR's. A IL-21 pode ser utilizada nas fases iniciais do processo, seguida por um enriquecimento do meio com IL-2 ou IL-15.(2) A

IL-21 estimula o desenvolvimento de células NK citotóxicas e a manutenção da sua viabilidade. Após a proliferação e manutenção da sua viabilidade, é necessário proceder à alteração ou adição de recetores CAR a estas células, nomeadamente, por exemplo, contra o recetor CD123, que está presente em excesso na maioria das leucemias mieloides agudas.(3, 13)

Resumidamente os passos gerais a ter em conta são (13):

1. Colheita de amostras, separação e depleção com recurso ao CliniMACS Prodigy®;
2. Cultura das células durante 14 dias com meio de cultura NK MACS, com suplementação de 5% de soro humano e 1000 IU/ml de IL-2, a 37°C com 5% CO₂;
3. Exposição das células a IL-2;
4. Exposição repetida a IL-2 e PBMC's.
5. Controlo da proliferação e viabilidade das células, com testes de citotoxicidade, desgranulação e produção de citocinas;
6. Transdução das células com alfa-retrovírus que codificam anti-CD123 CAR;
7. Controlo de transdução eficiente com microscopia fluorescente;
8. Controlo contra antigénios CD123 para verificar função das células alteradas.

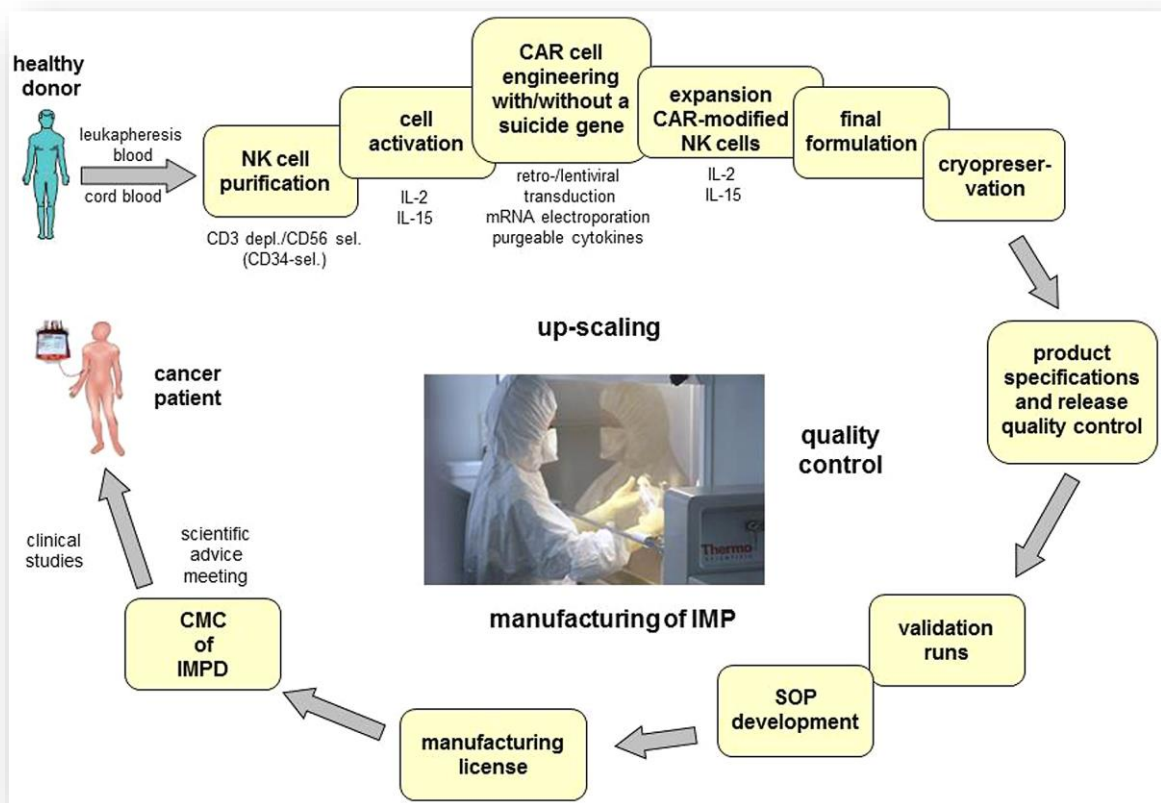


Figura 4 – Processo de produção GMP de células CAR-NK (Adaptado de "Advantages and applications of CAR-expressing natural killer cells")(15)

2.4. FORMAS DE UTILIZAÇÃO

As células CAR-NK, depois de preparadas precisam de ser administradas ao doente para que possam exercer o seu efeito. Assim, as células podem ser injetadas diretamente na corrente sanguínea do doente, ficando à mercê de qualquer ataque que possam sofrer ou qualquer reação que possa acontecer, que não está coberta pelos testes in vitro que foram previamente realizados. Esta injeção de células terá de ser sempre monitorizada devido a estas possíveis reações adversas. As células também terão de ser injetadas sob a forma de uma suspensão que seja compatível com estas e a sua estabilidade osmótica, bem como com o ambiente osmótico e homeostático do organismo humano. Após a injeção na corrente sanguínea estas irão exercer a sua atividade anti-tumoral, por reconhecimento dos antígenos contra os quais estão programadas com os seus CAR, preferencialmente ligando-se o mais rápido possível às células tumorais e exercendo o seu efeito de forma eficaz, uma vez que, o tempo de estabilidade e duração destas células ainda não é bem conhecido e precisa de ser aprimorado com mais estudos.(10, 14)

Uma outra forma de utilizar estas células na terapia oncológica é a administração direta das células no tumor, como no caso de linfomas, estando estas localizadas, desta forma, diretamente sobre o tumor e no qual podem exercer a sua atividade promovendo a redução do mesmo ou até o seu desaparecimento. Desta forma, também serão evitados, possivelmente, mais mecanismos que possam levar à destruição destas células precocemente. Contudo, é uma administração que está dependente do estado sólido destes tumores, bem como da sua localização, pois, poderá haver locais onde seja extremamente difícil fazer uma administração direta das CAR-NK.(10, 11, 14)

3. Aplicações terapêuticas em oncologia

3.1. CANCROS COM POSSÍVEL APLICAÇÃO

A terapia celular não pode ser aplicada a todos os tipos de cancro, visto que as células não conseguirão identificar todo o tipo de células patológicas devido à diferente localização dos tumores e à sua diferente natureza e complexidade. Assim, apenas alguns tipos de tumor começaram por ser estudados, nomeadamente aqueles cujo sucesso se prêve maior e onde as células CAR-NK possam ter maior utilidade.

Até ao momento as patologias em estudo são:

- Leucemia linfoblástica aguda B(5, 9, 11, 12)
- Linfomas(9, 11, 12)
- Leucemia mieloide aguda(8, 11)
- Mieloma múltiplo(5, 9)
- Glioblastoma(2, 5, 10, 16)
- Cancro de mama(2, 5, 17)
- Cancro dos ovários e células escamosas
- Neuroblastoma(5)

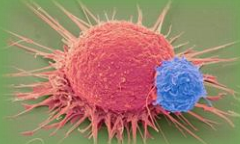
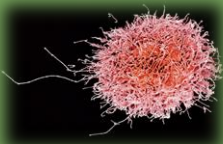
3.2. CONDIÇÕES BIOPATOLÓGICAS PARA PROPOSIÇÃO DE TRATAMENTO CAR-NK

Para além de nem todos os tipos de patologias oncológicas serem candidatas a um tratamento celular, também nem todos os doentes poderão ser eleitos para que possam ter esta terapia como opção. No geral, as condições fisiopatológicas do doente serão sempre fundamentais

para esta decisão, pois um doente que esteja extremamente debilitado não terá condições para responder ao tratamento devido a este ser relativamente invasivo e o efeito das células poder ser nefasto. Mas, o tratamento celular também não será, pelo menos para já, utilizado como uma primeira resposta face a uma patologia deste género. Assim, neste momento, esta terapia, tal como acontece com as já foram realizadas com células CAR-T, será um recurso que poderá ser usado em tumores que não respondem a outro tipo de terapias, como a quimioterapia ou radioterapia. Também serão um recurso em tumores que não são passíveis de ser resolvidos com auxílio de cirurgia. A terapia celular será assim uma alternativa ou complemento às terapias já existentes e previamente testadas, podendo ser utilizada em conjunto com estas para obtenção de melhores resultados.(12, 16)

4. Análise comparativa CAR-T vs CAR-NK

Tabela I – Vantagens e desvantagens de CAR T e NK(3, 15)

<p style="text-align: center;">CAR-T</p>  <p style="text-align: center;">Figura 5 - Célula T</p>	<p style="text-align: center;">CAR-NK</p>  <p style="text-align: center;">Figura 6 - Célula NK</p>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dependentes de compatibilidade do sistema HLA ▪ Bons resultados em linfomas e leucemias das células B ▪ Maior capacidade de replicação in vivo ▪ Produção de células pode demorar várias semanas ▪ Colheita autóloga complicada ▪ Risco de doença de enxerto contra o hospedeiro 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Independentes de compatibilidade: possibilidade de utilização de células alogénicas ▪ Possibilidade de ter um produto <i>off the shelf</i> ▪ Maior capacidade efetora ▪ Não causam doença de enxerto contra o hospedeiro ▪ Produção de células em poucos dias ▪ Capacidade de atividade anti tumoral além da que está introduzida por CAR.

5. Empresas existentes na área da biotecnologia celular aplicada às Car-NK

5.1. PATENTES ASSOCIADAS

Com o surgimento desta tecnologia também houve muitas empresas já relacionadas com o ramo da biologia celular que começaram a desenvolver os seus próprios produtos e, a registar ou pedir registo de patentes para produtos com aplicação clínica neste ramo. Assim, neste momento existem já diversas empresas com patentes associadas a elas, sendo que enumero em seguida algumas delas (informação retirada do sítio Espacenet.com, com a pesquisa realizada com a palavra-chave “CAR-NK”).

Tabela 2 – Carsgen therapeutics

Empresa	Carsgen Therapeutics
Número de Patentes	1 – GPC3-TARGETED CAR NK CELL
Descrição:	Criação de um CAR com especificidade para a GPC3 e o seu método de preparação, bem como consequentemente a sua utilização em prevenção e/ ou tratamento de tumores, em especial aqueles que expressam GPC3.

Tabela 3 – Asclepius Solutions, Inc.

Empresa	Asclepius Solutions, Inc.
Número de Patentes	1 – Chimeric antigen recipient cell taking ROBO1 as target, preparation and application thereof 2 – Specific antibody with CD20 as target, CAR-NK cell and preparation and application of CAR-NK cell 3 – Specific antibody taking CD19 as target point, CAR-NK cell as well as preparation and application thereof 4 – Specific antibody taking CD33 as target point, CAR-NK cell as well as preparation and application thereof
Descrição:	I- Criação de um CAR que tem como alvo o complexo ROBO1, com a sua preparação e aplicação em células CAR-NK. As células são capazes de manter a expressão do CAR criado, para além de manterem a secreção de moléculas PD-1. A combinação de ambos

os processos já provou aumentar a eficácia no tratamento de tumores que expressam estas moléculas.

- 2- A invenção consiste na criação de um anticorpo anti-CD20, com demonstração da sua manutenção e expressão em células CAR-NK bem como a possibilidade de aumentar a escala de produção e produção para utilização em estilo “*off the shelf*”. Estas células podem ser utilizadas no tratamento de linfomas com alta expressão de moléculas CD20.
- 3- A invenção consiste na criação de um anticorpo anti-CD19, com demonstração da sua manutenção e expressão em células CAR-NK, bem como a possibilidade de aumentar a escala de produção e produção para utilização em estilo “*off the shelf*”. Estas células podem ser utilizadas no tratamento de linfomas com alta expressão de moléculas CD19.
- 4- A invenção consiste na criação de um anticorpo anti-CD33, com demonstração da sua manutenção e expressão em células CAR-NK bem como a possibilidade de aumentar a escala de produção e produção para utilização em estilo “*off the shelf*”. Estas células podem ser utilizadas no tratamento de leucemias mielóides com alta expressão de moléculas CD33.

Tabela 4 – Shenzhen Teihua Cell Enginnering Co., Ltd.

Empresa	Shenzhen Taihua Cell Enginnering Co., Ltd.
Número de Patentes	I - <i>CAR-NK cell, and preparation method and application thereof</i>
Descrição:	<p>Desenvolvimento de células CAR-NK com descrição dos vários passos de desenvolvimento das mesmas: síntese de uma sequência CAR; integração da sequência num vetor do tipo lentivírus; desenvolvimento do plasmídeo criado em células T para recolha posterior de viriões capazes de transduzir a sequência criada; colheita do plasma autólogo e de células mononucleares do sangue periférico, ajustando todos os parâmetros do meio de cultura para o correto desenvolvimento das células NK e a sua proliferação; por fim a adição do viriões que vão proceder à transdução da sequência CAR e consequentemente a criação de células CAR-NK. Este método de tranfeção de células NK é considerado eficiente e estável.</p>

Tabela 5 – ATCG Suzhou Biotechnology

Empresa	ATCG Suzhou Biotechnology
Número de Patentes	<i>I - PD-1 (programmed cell death protein 1) CAR (chimeric antigen receptor) NK (natural killer)-92 cells as well as preparation method and application thereof</i>
Descrição: Criação de células CAR-NK com expressão da proteína PD-1 bem como o seu método de preparação e a sua posterior aplicação, utilizando células NK-92. Estas células podem ser produzidas em larga escala podendo ser aplicadas a diversos doentes sem risco de GVHD, com atividade citolítica aumentada com efeitos aumentados no tratamento de tumores.	

Tabela 6 – Immunomedics

Empresa	Immunomedics
Número de Patentes	<i>I - Disease Therapy With Chimeric Antigen Receptor (Car) Constructs And T Cells (Car-T) Or Nk Cells (Car-Nk) Expressing Car Constructs</i>
Descrição: A invenção tem aplicação a células CAR-T e CAR-NK, sendo um complexo constituído preferencialmente por uma porção scFv de um anticorpo contra um antígeno ou hapteno específico de doença. Estas células poderão ser aplicadas a doentes com a patologia alvo, podendo esta ser um tumor, uma doença auto-imune ou alguma disfunção imune, sendo que estas células irão em todos os casos desencadear uma resposta imune associada à patologia pretendida.	

Tabela 7 – Cerus Corporation

Empresa	Cerus Corporation
Número de Patentes	<i>I - COMPOSITIONS AND METHODS FOR IMPROVED NK CELL THERAPIES</i>
Descrição: Criação relacionada com a produção de células CAR-NK, criadas por um composto que tem como alvo o ácido nucleico.	

5.2. PRODUTOS LANÇADOS

Existem múltiplas possibilidades de aplicação deste tipo de células e terapia, mas a maioria dos produtos que poderão vir a existir ainda está sob estudo ou em análise em ensaios clínicos. Contudo existe uma empresa, a Fate Therapeutics, que tem já disponível a comercialização de 4 produtos derivados de células NK. Assim, numa breve descrição dos mesmos, estes são (informação retirada do site oficial da empresa “<https://fatetherapeutics.com/>”):

- **FT500** → células NK *off-the-shelf* derivadas de linha clonal de iPSC, com obtenção de uma população homogénea de células. Estas podem ser criopreservadas e podem ser feitas re-injeções das mesmas se necessário. Estas células vão interagir com células T e produzir o seu efeito máximo em doentes com tratamento anti-PD1 e anti-PDL-1, com libertação de grânulos citotóxicos e consequente lise das células tumorais, e secreção de citocinas inflamatórias para um aumento da atividade das células T.
- **FT516** → células NK *off-the-shelf* derivadas de linha clonal de iPSC, com obtenção de uma população homogénea de células dirigidas a CD16. Um novo recetor hnCD16 evita que este sofra degradação e desagregação da superfície das células após a sua ativação. Foi demonstrado que estas células têm uma poderosa ação anti-tumoral em diversos tipos de cancro, sendo esta ação potente e persistente, especialmente quando combinada com medicamentos anti-tumorais tais como a Herceptina, por exemplo.
- **FT538** → células NK *off-the-shelf* derivadas de linha clonal de iPSC, produzidas com depleção do antigénio CD38 e com presença do recetor hnCD16, para que doentes que façam terapia com anticorpos anti-CD38 não sofram uma depleção da população de células NK, visto que estas possuem naturalmente na sua superfície este antigénio. Estas células foram desenvolvidas para serem utilizadas em conjunto com medicamentos como o DARZALEX®.
- **FT596** → células CAR-NK *off-the-shelf* derivadas de linha clonal de iPSC, para serem utilizadas em monoterapia ou em conjunto com medicamentos com o rituximab, em patologias de células-B. Estas células são constituídas por um recetor CAR anti-CD19, um recetor hnCD16 e ainda um recetor de fusão IL-15 de forma a que a persistência e a capacidade de expansão das células se mantenha, sem que seja necessário uma administração adicional de citocinas.

6. Ensaio Clínicos

Com o desenvolvimento da tecnologia CAR, cada vez são mais os produtos que começam a ser colocados sobre ensaio clínico para que realmente se perceba se estes poderão ter uma futura aplicação na medicina ou se ainda acarretam demasiados riscos ou falhas para que possam ser comercializados. A maioria destes ensaios de momento está a decorrer no continente asiático, nomeadamente na China. Estas são as empresas que mais rapidamente desenvolveram produtos para serem testados em humanos. Para além disso ainda são todos ensaios que estão na sua fase inicial, ou seja, ainda estão todos em fase de recrutamento ou ainda em espera para começar o recrutamento de voluntários.(3) Assim, apresento em seguida os mais relevantes para o tema em questão (informação retirada do site ClinicalTrials.gov, com pesquisa das palavras chave “CAR-NK”).

Tabela 8 – Ensaio Clínico 1

1. Study of Anti-CD22 CAR NK Cells in Relapsed and Refractory B Cell Lymphoma			<u>NCT Number</u> NCT03692767
<u>Estado</u>	Ainda não está a recrutar		
<u>Condições</u>	Linfoma de células-B refratário		
<u>Caraterísticas</u>	Tipo de estudo: Intervenção	Fase: Fase I	Design do estudo: - Modelo de intervenção: Sequencial - Propósito primário: Tratamento
<u>Patrocinador</u>	Allife Medical Science and Technology Co., Ltd.		

Tabela 9 – Ensaio Clínico 2

2. Study of Anti-CD19 CAR NK Cells in Relapsed and Refractory B Cell Lymphoma			<u>NCT Number</u> NCT03690310
<u>Estado</u>	Ainda não está a recrutar		
<u>Condições</u>	Linfoma de células-B refratário		
<u>Caraterísticas</u>	Tipo de estudo: Intervenção	Fase: Fase I	Design do estudo: - Modelo de intervenção: Sequencial - Propósito primário: Tratamento
<u>Patrocinador</u>	Allife Medical Science and Technology Co., Ltd.		

Tabela 10 – Ensaio Clínico 3

3. Study of Anti-Mesothelin Car NK Cells in Epithelial Ovarian Cancer			<u>NCT Number</u> NCT03692637
<u>Estado</u>	Ainda não está a recrutar		
<u>Condições</u>	Cancro epitelial do ovário		
<u>Caraterísticas</u>	Tipo de estudo: Intervenção	Fase: Fase I	Design do estudo: - Modelo de intervenção: Grupo único - Propósito primário: Tratamento
<u>Patrocinador</u>	Allife Medical Science and Technology Co., Ltd.		

Tabela 11 – Ensaio Clínico 4

4. Study of Anti-PSMA CAR NK Cell in Castration-Resistant Prostate Cancer			<u>NCT Number</u> NCT03692663
<u>Estado</u>	Ainda não está a recrutar		
<u>Condições</u>	Cancro da próstata		
<u>Caraterísticas</u>	Tipo de estudo: Intervenção	Fase: Fase I	Design do estudo: - Modelo de intervenção: Sequencial - Propósito primário: Tratamento
<u>Patrocinador</u>	Allife Medical Science and Technology Co., Ltd.		

Tabela 12 – Ensaio Clínico 5

5. Pilot Study of NKG2D-Ligand Targeted CAR-NK Cells in Patients With Metastatic Solid Tumours			<u>NCT Number</u> NCT03415100
<u>Estado</u>	A recrutar		
<u>Condições</u>	Tumores sólidos		
<u>Caraterísticas</u>	Tipo de estudo: Intervenção	Fase: Fase I	Design do estudo: - Modelo de intervenção: Grupo único - Propósito primário: Tratamento
<u>Patrocinador</u>	The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University		

Tabela 13 – Ensaio Clínico 6

6. Clinical Research of ROBO1 Specific CAR-NK Cells on Patients With Solid Tumors			<u>NCT Number</u> NCT03940820
<u>Estado</u>	A recrutar		
<u>Condições</u>	Tumores sólidos		
<u>Caraterísticas</u>	Tipo de estudo: Intervenção	Fase: Fase I Fase II	Design do estudo: - Modelo de intervenção: Grupo único - Propósito primário: Tratamento
<u>Patrocinador</u>	Asclepius Technology Company Group (Suzhou) Co., Ltd.		

Tabela 14 – Ensaio Clínico 7

7. Clinical Research of Adoptive BCMA CAR-NK Cells on Relapse/Refractory MM			<u>NCT Number</u> NCT03940833
<u>Estado</u>	A recrutar		
<u>Condições</u>	Mieloma múltiplo		
<u>Caraterísticas</u>	Tipo de estudo: Intervenção	Fase: Fase I Fase II	Design do estudo: - Modelo de intervenção: Grupo único - Propósito primário: Tratamento
<u>Patrocinador</u>	Asclepius Technology Company Group (Suzhou) Co., Ltd.		

Tabela 15 – Ensaio Clínico 8

8. Study of Anti-CD19/CD22 CAR NK Cells in Relapsed and Refractory B Cell Lymphoma			<u>NCT Number</u> NCT03824964
<u>Estado</u>	Ainda não está a recrutar		
<u>Condições</u>	Linfoma de células-B refractário		
<u>Caraterísticas</u>	Tipo de estudo: Intervenção	Fase: Fase I	Design do estudo: - Modelo de intervenção: Grupo único - Propósito primário: Tratamento
<u>Patrocinador</u>	Allife Medical Science and Technology Co., Ltd. Beijing Cancer Hospital		

Tabela 16 – Ensaio Clínico 9

9. PCAR-119 Bridge Immunotherapy Prior to Stem Cell Transplant in Treating Patients With CD19 Positive Leukemia and Lymphoma			<u>NCT Number</u> NCT02892695
<u>Estado</u>	A recrutar		
<u>Condições</u>	Leucemia linfocítica aguda; Leucemia linfocítica crónica; Linfoma folicular; Linfoma de células do manto		
<u>Caraterísticas</u>	Tipo de estudo: Intervenção	Fase: Fase I Fase II	Design do estudo: - Modelo de intervenção: Grupo único - Propósito primário: Tratamento
<u>Patrocinador</u>	<i>PersonGen BioTherapeutics (Suzhou) Co., Ltd.</i> <i>The First People's Hospital of Hefei</i> <i>Hefei Binhu Hospital</i>		

Tabela 17 – Ensaio Clínico 10

10. Clinical Research of ROBO1 Specific BiCAR-NK Cells on Patients With Pancreatic Cancer			<u>NCT Number</u> NCT03941457
<u>Estado</u>	A recrutar		
<u>Condições</u>	Cancro pancreático		
<u>Caraterísticas</u>	Tipo de estudo: Intervenção	Fase: Fase I Fase II	Design do estudo: - Modelo de intervenção: Grupo único - Propósito primário: Tratamento
<u>Patrocinador</u>	<i>Asclepius Technology Company Group (Suzhou) Co., Ltd.</i>		

Tabela 18 – Ensaio Clínico 11

11. Clinical Research of ROBO1 Specific BiCAR-NK/T Cells on Patients With Malignant Tumor			<u>NCT Number</u> NCT03931720
<u>Estado</u>	A recrutar		
<u>Condições</u>	Tumores malignos		
<u>Caraterísticas</u>	Tipo de estudo: Intervenção	Fase: Fase I Fase II	Design do estudo: - Modelo de intervenção: Grupo único - Propósito primário: Tratamento
<u>Patrocinador</u>	Asclepius Technology Company Group (Suzhou) Co., Ltd.		

Tabela 19 – Ensaio Clínico 12

12. CAR.CD19-CD28-zeta-2A-iCasp9-IL15-Transduced Cord Blood NK Cells, High-Dose Chemotherapy, and Stem Cell Transplant in Treating Participants With B-cell Lymphoma			<u>NCT Number</u> NCT03931720
<u>Estado</u>	Ainda não está a recrutar		
<u>Condições</u>	Linfomas CD19 positivos		
<u>Caraterísticas</u>	Tipo de estudo: Intervenção	Fase: Fase I Fase II	Design do estudo: - Modelo de intervenção: Grupo único - Propósito primário: Tratamento
<u>Patrocinador</u>	M.D. Anderson Cancer Center National Cancer Institute (NCI).		

Tabela 20 – Ensaio Clínico 13

13. Umbilical & Cord Blood (CB) Derived CAR-Engineered NK Cells for B Lymphoid Malignancies			<u>NCT Number</u> NCT03056339
<u>Estado</u>	A recrutar		
<u>Condições</u>	Linfomas e leucemias de células-B; Leucemia linfocítica aguda; Leucemia linfocítica crónica; Linfoma não-Hodgkin		
<u>Caraterísticas</u>	Tipo de estudo: Intervenção	Fase: Fase I Fase II	Design do estudo: - Modelo de intervenção: Grupo único - Propósito primário: Tratamento
<u>Patrocinador</u>	M.D. Anderson Cancer Center		

7. Perspetivas futuras

A tecnologia CAR-NK é sem dúvida muito inovadora e promissora para o futuro da medicina. Futuramente, através desta mesma tecnologia poderão existir tratamentos mais eficazes, mais rápidos e também seguros para o tratamento de diversas patologias oncológicas, como já foi descrito. Mas também poderão ser desenvolvidas terapêuticas para outras patologias que ainda não se encontram dentro das possibilidades neste momento, uma vez que, esta é uma terapia com muito para oferecer e para descobrir até estar completamente aproveitada.(1)

Será também possível combater algumas patologias infecciosas que têm um grande impacto negativo na sociedade, como por exemplo o HIV, visto que no modo de operar das células NK já está previsto o combate a células infetadas, sendo que precisamos apenas de conseguir aumentar o potencial destas células e aprimorar a sua atividade.(5-7)

8. Conclusão

A terapia celular com células CAR-NK é muito promissora e apesar de ainda estar na sua fase inicial, com certeza que muitas mais possibilidades irão surgir nos próximos anos. É necessário perceber todas as otimizações que são necessárias para que o tratamento celular seja um sucesso de valor acrescentado para os doentes, como aliás já se sabe que será.

A gama de patologias em que esta tecnologia poderá ser aplicada será grande visto que as células NK têm a capacidade de reconhecer, não só, células tumorais, mas também células infetadas com patógenos externos, como o caso dos vírus. Para além disso, os CAR podem ser programados e criados da forma que for pretendida pelo que será possível tentar combater outras patologias em que estejam envolvidas células com alterações que possam ser reconhecidas por células NK.

Com esta tecnologia será possível não só dar uma resposta mais específica para cada patologia, mas aumentar a eficácia do tratamento, com um grau de invasão muito inferior a muitas das terapias que já existem. Será possível também iniciar a terapia e terminar a mesma rapidamente, de forma a que a atividade das células seja a estritamente a necessária, diminuindo assim os efeitos adversos e secundários que poderiam existir ou que estão associados a outros tratamentos.

Esta é uma terapia que vai de encontro ao que será o futuro da medicina com terapias cada vez mais personalizadas em que se consiga um tratamento mais eficaz, mais seguro e com maior qualidade para cada doente.

9. Bibliografia

1. Rezvani K, Rouce R, Liu E, Shpall E. – Engineering Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther.* 2017;25(8):1769-81.
2. Fang F, Xiao W, Tian Z. – NK cell-based immunotherapy for cancer. *Semin Immunol.* 2017;31:37-54.
3. Hu Y, Tian ZG, Zhang C. – Chimeric antigen receptor (CAR)-transduced natural killer cells in tumor immunotherapy. *Acta Pharmacol Sin.* 2018;39(2):167-76.
4. Martin-Antonio B, Sune G, Perez-Amill L, Castella M, Urbano-Ispizua A. – Natural Killer Cells: Angels and Devils for Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9).
5. Liu D, Tian S, Zhang K, Xiong W, Lubaki NM, Chen Z, et al. – Chimeric antigen receptor (CAR)-modified natural killer cell-based immunotherapy and immunological synapse formation in cancer and HIV. *Protein Cell.* 2017;8(12):861-77.
6. Mazarzaei A, Vafaei M, Ghasemian A, Mirforughi SA, Rajabi Vardanjani H, Alwan NAS. – Memory and CAR-NK cell-based novel approaches for HIV vaccination and eradication. *J Cell Physiol.* 2019.
7. Zenere G, Olwenyi OA, Byrareddy SN, Braun SE. – Optimizing intracellular signaling domains for CAR NK cells in HIV immunotherapy: a comprehensive review. *Drug Discov Today.* 2019;24(4):983-91.
8. Kloess S, Oberschmidt O, Dahlke J, Vu XK, Neudoerfl C, Kloos A, et al. – Preclinical Assessment of Suitable Natural Killer Cell Sources for Chimeric Antigen Receptor Natural Killer-Based "Off-the-Shelf" Acute Myeloid Leukemia Immunotherapies. *Hum Gene Ther.* 2019;30(4):381-401.
9. Romanski A, Uherek C, Bug G, Seifried E, Klingemann H, Wels WS, et al. – CD19-CAR engineered NK-92 cells are sufficient to overcome NK cell resistance in B-cell malignancies. *J Cell Mol Med.* 2016;20(7):1287-94.
10. Han J, Chu J, Keung Chan W, Zhang J, Wang Y, Cohen JB, et al. – CAR-Engineered NK Cells Targeting Wild-Type EGFR and EGFRvIII Enhance Killing of Glioblastoma and Patient-Derived Glioblastoma Stem Cells. *Sci Rep.* 2015;5:11483.
11. Liu E, Tong Y, Dotti G, Shaim H, Savoldo B, Mukherjee M, et al. – Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity. *Leukemia.* 2018;32(2):520-31.

12. Oelsner S, Friede ME, Zhang C, Wagner J, Badura S, Bader P, et al. – Continuously expanding CAR NK-92 cells display selective cytotoxicity against B-cell leukemia and lymphoma. *Cytotherapy*. 2017;19(2):235-49.
13. Kloss S, Oberschmidt O, Morgan M, Dahlke J, Arseniev L, Huppert V, et al. – Optimization of Human NK Cell Manufacturing: Fully Automated Separation, Improved Ex Vivo Expansion Using IL-21 with Autologous Feeder Cells, and Generation of Anti-CD123-CAR-Expressing Effector Cells. *Hum Gene Ther*. 2017;28(10):897-913.
14. Zhang J, Zheng H, Diao Y. – Natural Killer Cells and Current Applications of Chimeric Antigen Receptor-Modified NK-92 Cells in Tumor Immunotherapy. *Int J Mol Sci*. 2019;20(2).
15. Glienke W, Esser R, Priesner C, Suerth JD, Schambach A, Wels WS, et al. – Advantages and applications of CAR-expressing natural killer cells. *Front Pharmacol*. 2015;6:21.
16. Murakami T, Nakazawa T, Natsume A, Nishimura F, Nakamura M, Matsuda R, et al. – Novel Human NK Cell Line Carrying CAR Targeting EGFRvIII Induces Antitumor Effects in Glioblastoma Cells. *Anticancer Res*. 2018;38(9):5049-56.
17. Chen X, Han J, Chu J, Zhang L, Zhang J, Chen C, et al. – A combinational therapy of EGFR-CAR NK cells and oncolytic herpes simplex virus I for breast cancer brain metastases. *Oncotarget*. 2016;7(19):27764-77.