



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Beatriz Duarte Gameiro Matias

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Vírus oncolíticos a nova abordagem à terapêutica oncológica” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, da Dra. Joana Martins de Carvalho, da Dra. Ana Sofia Silva e do Professor Doutor Sérgio Simões, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2020



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Beatriz Duarte Gameiro Matias

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Vírus oncolíticos a nova abordagem à terapêutica oncológica” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, da Dra. Joana Martins de Carvalho, da Dra. Ana Sofia Silva e do Professor Doutor Sérgio Simões, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado e Ciências Farmacêuticas.

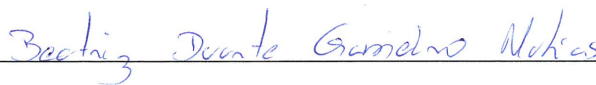
Setembro 2020

## Declaração de Autoria

Eu, Beatriz Duarte Gameiro Matias, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2015241035, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Vírus oncolíticos a nova abordagem à terapêutica oncológica” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 21 de setembro de 2020.



(Beatriz Duarte Gameiro Matias)

## Agradecimentos

À Dra. Joana Carvalho e toda a equipa técnica da Farmácia Rodrigues da Silva,  
pela transmissão de valores e competências de trabalho.

À Dra. Ana Sofia Silva e toda a equipa do departamento da Compliance da Bluepharma pelo  
exemplo de união, espírito de equipa e dedicação.

Ao Professor Doutor Sérgio Simões pelo rigor, simpatia e pela orientação na realização da  
minha monografia.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por garantir  
a excelência dos que por ela passam.

À Phartuna - Tuna de Farmácia de Coimbra pelos desafios,  
aventuras e amizades que guardo.

Aos meus amigos, por comigo seguirem viagem.

À minha família, todas as conquistas a eles são dedicadas.

A todos muito obrigada!

## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>6</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2. ANÁLISE SWOT</b> .....	<b>9</b>
2.1. PONTOS FORTES.....	9
2.1.1. <i>Localização da farmácia</i> .....	9
2.1.2. <i>Dermofarmácia e cosmética</i> .....	10
2.1.3. <i>Serviços disponibilizados</i> .....	10
2.1.4. <i>Gestão comercial</i> .....	10
2.2. PONTOS FRACOS .....	11
2.2.1. <i>Manipulados</i> .....	11
2.2.2. <i>Período de confinamento</i> .....	12
2.3. OPORTUNIDADES .....	12
2.3.1. <i>Formação profissional contínua</i> .....	12
2.3.2. <i>Relação interpessoal com os utentes</i> .....	13
2.3.3. <i>Clientes internacionais</i> .....	13
2.3.4. <i>Novo módulo de atendimento do Sifarma®</i> .....	14
2.4. AMEAÇAS .....	14
2.4.1. <i>Uso irresponsável do medicamento</i> .....	14
2.4.2. <i>Medicamentos esgotados</i> .....	14
2.4.3. <i>Locais de venda de MNSRM</i> .....	15
<b>3. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>16</b>
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>17</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>19</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>20</b>
<b>1. NOTA INTRODUTÓRIA</b> .....	<b>21</b>
<b>2. BLUEPHARMA – HISTÓRIA E MISSÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>3. COMPLIANCE – DEFINIÇÃO E ENQUADRAMENTO</b> .....	<b>22</b>
3.1. DEPARTAMENTO DE COMPLIANCE NA BLUEPHARMA .....	23
<b>4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS</b> .....	<b>25</b>
4.1. ATUALIZAÇÃO DE CEPS .....	25
4.2. SUBMISSÃO DE UMA ALTERAÇÃO .....	25
4.3. WORKPLAN .....	27
4.4. ATUALIZAÇÃO DO DOSSIER DO MEDICAMENTO .....	27
4.5. ORGANIZAÇÃO DO MÓDULO 3 DO DOSSIER FORMATO CTD .....	28
<b>5. ANÁLISE SWOT</b> .....	<b>29</b>
5.1. PONTOS FORTES.....	29
5.1.1. <i>Autonomia nas atividades desenvolvidas</i> .....	29
5.1.2. <i>Espírito de equipa</i> .....	29
5.1.3. <i>Plano de formação</i> .....	30
5.2. PONTOS FRACOS .....	30
5.2.1. <i>Duração do estágio</i> .....	30
5.2.2. <i>Diferentes departamentos</i> .....	31
5.3. OPORTUNIDADES .....	31
5.3.1. <i>Estágio curricular na área do medicamento</i> .....	31
5.3.2. <i>Novo departamento</i> .....	31
5.3.3. <i>Teletrabalho</i> .....	32

5.4.	AMEAÇAS .....	32
5.4.1.	<i>Sobrecarga de atividades</i> .....	32
6.	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	33
7.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	34
	<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>36</b>
	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>37</b>
	<b>RESUMO</b> .....	<b>38</b>
	<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>39</b>
1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>41</b>
2.	<b>VÍRUS ONCOLÍTICOS</b> .....	<b>42</b>
2.1.	MECANISMO DE INFEÇÃO VIRAL.....	44
2.1.1	<i>Replicação viral</i> .....	44
2.1.2.	<i>Sistema imunológico</i> .....	44
2.2.	BARREIRAS À UTILIZAÇÃO .....	46
3.	<b>TROPISMO NATURAL</b> .....	<b>47</b>
3.1.	MARCADORES DE SUPERFÍCIE.....	47
3.2.	VIAS INTRACELULARES DEFEITUOSAS .....	48
4.	<b>ESTRATÉGIAS DE OTIMIZAÇÃO</b> .....	<b>48</b>
4.1.	AUMENTO DA SELETIVIDADE .....	48
4.1.1.	<i>Marcadores de superfície</i> .....	49
4.1.2.	<i>Diminuição da virulência</i> .....	49
4.1.3.	<i>Promotores específicos de tecido ou tumor</i> .....	50
4.1.4.	<i>MicroRNA</i> .....	51
4.2.	POTENCIAR A ENTREGA INTRACELULAR .....	52
4.2.1.	<i>Células transportadoras</i> .....	52
4.2.2.	<i>Polímeros</i> .....	53
4.2.3.	<i>Lipossomas</i> .....	53
4.3.	AUMENTO DA EFICÁCIA.....	54
4.3.1.	<i>Potenciar a resposta do sistema imunológico</i> .....	54
4.3.1.1.	<i>Citocinas e quimiocinas</i> .....	54
4.3.1.2.	<i>Moléculas co-inibidoras e co-estimuladoras</i> .....	55
4.3.2.	<i>Potenciar a morte celular</i> .....	56
4.3.2.1.	<i>Genes suicidas</i> .....	56
4.3.2.1.1.	<i>Enzimas conversoras de pro-fármacos</i> .....	57
4.3.2.1.2.	<i>Genes supressores de tumor ou pro-apoptóticos</i> .....	57
4.3.2.2.	<i>Anti-angiogênese</i> .....	58
5.	<b>PRODUTOS APROVADOS</b> .....	<b>59</b>
5.1.	<b>RIGVIR® (ECHO-7)</b> .....	59
5.2.	<b>ONCORINE® (H101)</b> .....	59
5.3.	<b>IMLYGIC® (T-VEC)</b> .....	60
6.	<b>ENSAIOS CLÍNICOS</b> .....	<b>60</b>
7.	<b>CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS</b> .....	<b>61</b>
8.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>62</b>
	<b>ANEXO</b> .....	<b>69</b>

# **CAPÍTULO I**

## **Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária**

Farmácia Rodrigues da Silva

Coimbra

# ABREVIATURAS

ANF - Associação Nacional das Farmácias

FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM - Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MSRM - Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

SNS - Sistema Nacional de Saúde

SWOT - *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*



# I. INTRODUÇÃO

A farmácia comunitária é tida como referência na área da saúde por ser um local de proximidade e de fácil acessibilidade entre o utente e um agente de saúde pública. Como resultado o papel do farmacêutico deve ser multidisciplinar atuando diretamente no aconselhamento do medicamento e indiretamente na melhoria da qualidade de vida da população. Ao farmacêutico compete zelar pela promoção da saúde pública através do esclarecimento e do aconselhamento aos utentes (*Ordem dos Farmacêuticos*, [s.d.]).

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas contempla no seu plano de estudos a realização de um estágio curricular em farmácia comunitária no quinto ano. O estágio em farmácia comunitária pretende aplicar e desenvolver competência que refletem a aprendizagem desenvolvida ao longo da formação académica de cada aluno e que o mesmo tenha a oportunidade de contactar com o ambiente profissional. O meu estágio curricular em farmácia comunitária foi realizado em Coimbra na Farmácia Rodrigues da Silva sob a orientação da Dra. Joana Martins de Carvalho.

O presente relatório de estágio está estruturado na forma de análise SWOT sendo feita a avaliação do ambiente interno em pontos fortes (*Strengths*) e pontos fracos (*Weaknesses*) e a análise do ambiente externo em oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*).

## 2. Análise SWOT



*Figura 1 - Resumo esquemático da análise SWOT relativa ao estágio na Farmácia Rodrigues da Silva.*

### 2.1. Pontos Fortes

#### 2.1.1. Localização da farmácia

A Farmácia Rodrigues da Silva encontra-se em plena baixa de Coimbra na Rua Ferreira Borges. A localização privilegiada junto à escadaria que permite o acesso à Praça do Comércio, na confluência da Rua do Quebra Costas com a Rua Ferreira Borges e mais adiante na direção do Arco da Almedina transmite um ambiente circundante característico de uma zona comercial turística devido aos marcos históricos localizados na área envolvente e também ao comércio que aí se desenvolveu bem como as zonas de restauração. Todos estes aspetos contribuem para a elevada diversidade de utentes que recorrem aos serviços prestados na farmácia.

Esta heterogeneidade de utentes leva a diferentes propósitos na vinda à farmácia, isto é, podemos ter utentes fidelizados e que recorrem à farmácia para a dispensa de receituário e para beneficiar do aconselhamento do farmacêutico e podemos ter também um visitante da

cidade que procura um aconselhamento e/ou produtos específicos da farmácia. Este contacto diferenciador com uma ampla variedade de utentes e situações permitiu o enriquecimento dos conhecimentos técnico-científicos e a aplicação dos mesmos na área do aconselhamento de produtos de saúde e bem-estar. Pessoalmente foi desafiante no ponto de vista da comunicação com diferentes utentes de diferentes nacionalidades permitindo a aplicação no dia-a-dia de diferentes idiomas.

### **2.1.2. Dermofarmácia e cosmética**

A farmácia desenvolve ao longo do ano um esquema de rotação dos produtos nos lineares e nas gôndolas consoante a sazonalidade e a procura por parte dos utentes. A principal aposta reside nos produtos de dermofarmácia e cosmética e em suplementos alimentares. A sua divulgação é feita através de campanhas promocionais, exposição na montra e aconselhamento dirigido. A procura por estes tipos de produtos exige ao farmacêutico o conhecimento nestas áreas.

Na farmácia recebi uma formação inicial detalhada por parte da equipa sobre as diferentes áreas, que permitiu a consolidação dos conceitos adquiridos no plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) e que posteriormente permitiu a autonomia no aconselhamento aos utentes.

### **2.1.3. Serviços disponibilizados**

Na farmácia Rodrigues da Silva os utentes têm à sua disponibilidade a realização da medição de alguns parâmetros bioquímicos, como a glicémia e o colesterol total. É também possível medir a pressão arterial, o peso e altura em que se calcula o respetivo Índice de Massa Corporal. Estes serviços permitem um aconselhamento personalizado para cada utente e assim o seu acompanhamento quanto à promoção de um estilo de vida mais saudável que contribui assim para a adoção de medidas não farmacológicas consoante o seu estado clínico. Este acompanhamento personalizado proporciona uma relação mais próxima com o utente e reforça a confiança no farmacêutico.

### **2.1.4. Gestão comercial**

Atualmente as farmácias integram um modelo de gestão comercial onde o setor se subdivide em grupos de compras, isto é, a farmácia Rodrigues da Silva está associada a outras farmácias, onde a gestão de compras é realizada em conjunto e permite uma maior margem

negocial. Estas condições de mercado implicam uma gestão entre o volume de vendas e consequente volume de compras e as condições de preço que o laboratório/ fornecedor aplica ao grupo. A vantagem em gerir várias farmácias em conjunto é que o somatório das necessidades de cada farmácia para determinado produto, permite uma condição de compra mais vantajosa, isto é, o desconto que o laboratório/ fornecedor aplica consoante o volume da compra no preço final é superior ao desconto ou bonificação que a farmácia obterá se realizasse a compra individualmente.

No ato da dispensa de um medicamento o sistema Sifarma<sup>®</sup> permite a análise da rentabilidade da venda consoante o laboratório. No sistema é armazenada toda a informação introduzida no ato da receção das encomendas, não sendo simplesmente a confirmação das quantidades e preços de venda. A receção de uma encomenda permite automaticamente fornecer informação sobre o preço de venda à farmácia podendo estar associado a descontos comerciais e que deste modo ficam determinadas as margens de rentabilidade para a farmácia na dispensa deste medicamento.

A vantagem reside no intervalo entre o preço de venda para a farmácia e o preço de compra do distribuidor ou o preço de venda do laboratório, quando mais próximos forem estes valores mais vantajoso é para a farmácia pois no caso de Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM) o preço de venda ao público resulta da comparação com o preço em vigor nos países de referência, resultando a média dos países à qual acrescem as margens de comercialização, taxa de comercialização e o IVA, resultando o preço de venda ao público máximo a vigorar. As normas de formação de preços de medicamentos comparticipáveis são definidas pelo artigo 10.º do Decreto-Lei n.º 97/2015, conjugado com os artigos 6.º e 9.º da Portaria n.º 195-C/2015, de 30 de junho.

Toda esta análise das condições comerciais e o acompanhamento do mercado foi me inculcada no quotidiano da gestão da farmácia Rodrigues da Silva pois é um fator importantíssimo para a manutenção de um estabelecimento de serviços que atua num mercado tão abrangente e fortemente restrito e regulado.

## **2.2. Pontos Fracos**

### **2.2.1. Manipulados**

A preparação de medicamentos manipulados é uma prática cada vez mais em desuso, graças à crescente industrialização da produção de medicamentos, reservando-se apenas para

terapêuticas individualizadas muito específicas, para as quais ainda não existem alternativas no mercado.

Atualmente a farmácia Rodrigues da Silva não realiza manipulados, mantendo o local do laboratório para a reconstituição de antibióticos. Neste sentido não pude aplicar os conceitos galénicos na preparação de manipulados.

## **2.2.2. Período de confinamento**

Durante o período de confinamento a maioria dos utentes da farmácia eram os utentes de idade que dependiam de transportes públicos ou de outras pessoas, pois tinham mais dificuldades em se deslocar e sendo um dos grupos de risco esta deslocação tinha de ser reduzida ao essencial. Neste período a farmácia realizou algumas entregas ao domicílio aos seus utentes para garantir a continuação da terapêutica. O movimento comercial e o volume de vendas reduziram drasticamente o que levou a um impacto negativo na farmácia. Como o meu estágio foi repartido passei pela fase anterior ao surgimento do vírus SARS-CoV-2 bem como o período de adaptação do atendimento na farmácia e o período posterior ao período de confinamento, com a retoma do estágio e o gradual desconfinamento.

A situação exigiu uma organização e disponibilização de informação por parte do SNS e da ANF a qual poderia ter sido mais próxima da realidade das farmácias (Cedime, 2020). Muitas das medidas a tomar foram adotadas por iniciativa da farmácia com base em modelos já utilizados noutros países onde já se verificava uma maior propagação dos casos e assim permitiu adotar medidas defensivas e preventivas de possíveis focos contagioso.

## **2.3. Oportunidades**

### **2.3.1. Formação profissional contínua**

Durante o meu período de estágio tive a oportunidade de realizar uma formação na área dos suplementos alimentares realizada pela Pharma Nord®, bem como um *workshop* “Cosméticos Antienvhecimento: o papel do farmacêutico” realizado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) ministrado pelo grupo Alès Groupe Portugal. Simultaneamente tive a vantagem de me inscrever na Academia Cosmética Activa, que disponibiliza uma plataforma de informação dirigida a profissionais de saúde sobre as marcas comerciais Vichy®, La Roche-Posay®, Roger & Gallet®, Skinceuticals® e Cerave®. Todas estas atividades promovem o conhecimento dos produtos e de informação na área para a qual são aplicados.

Simultaneamente os laboratórios promovem ações de formação diferenciada junto dos profissionais na própria farmácia, que permite assim aplicar uma abordagem mais adequada e personalizada por parte do farmacêutico no ato de aconselhamento ao utente nesses produtos.

### **2.3.2. Relação interpessoal com os utentes**

A farmácia é um local de proximidade entre os utentes e os profissionais da área da saúde. O espectro de conhecimento do farmacêutico permite que este tenha o reconhecimento por parte dos utentes das suas competências e o seu aconselhamento é um fator decisivo e de elevada importância no cumprimento da terapêutica implementada pelo médico. Temos o dever de zelar pela saúde da população e o primeiro passo é iniciado muitas vezes na farmácia. Temos de assegurar que o utente respeita a terapêutica instituída pelo médico e assim garantir a correta utilização. Uma pequena palavra pode mudar a vida de alguém. Não devemos de nos cingir a vender caixas porque não é isso que fazemos, temos de ir mais além e fazer a diferença na vida de alguém. Esta relação próxima com os utentes permite acompanhar a sua evolução terapêutica e valorizar a qualidade de vida do utente.

### **2.3.3. Clientes internacionais**

O grande fluxo de visitantes estrangeiros na zona da baixa da cidade onde se localiza a farmácia leva a que esta seja um local conveniente e próximo para recorrerem quando se deparam com alguma situação que implique aconselhamento por parte de um profissional de saúde. Este facto proporcionou a aquisição de experiência no aconselhamento de uma grande variedade de áreas terapêuticas. Exigindo o desenvolvimento da capacidade comunicativa com o utente em termos científicos numa grande variedade de idiomas.

Também é relevante salientar que uma parte importante do atendimento era a solicitação de produtos, maioritariamente Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM), os quais o nome comercial não se encontrava comercializado em Portugal. Nesta perspetiva procurávamos o equivalente terapêutico com a composição quantitativa e qualitativa no sistema Sifarma<sup>®</sup>, por vezes não tínhamos um medicamento correspondente e nestes casos era necessário aconselhar outro produto que pertencesse ao mesmo grupo terapêutico.

### **2.3.4. Novo módulo de atendimento do Sifarma®**

O Sifarma 2000® tem vindo a ser atualizado e atualmente encontra-se em fase piloto o módulo de atendimento. Durante o meu estágio tive a oportunidade de trabalhar em simultâneo com as duas versões durante o atendimento. O novo módulo de atendimento é mais interativo a nível de *design* gráfico tornando-se mais intuitivo e proporcionando um atendimento mais rápido. Tem diferentes ferramentas que permitem uma maior conectividade com o cartão Saúde® e é uma ferramenta que centraliza o processo de atendimento no utente. Algumas das novas funcionalidades são o acesso ao histórico de consumo do utente e da informação do médico prescriptor, incentivando o acompanhamento personalizado e a relação de proximidade com o farmacêutico.

## **2.4. Ameaças**

### **2.4.1. Uso irresponsável do medicamento**

A banalização do consumo de determinados princípios ativos tem vindo a incutir na população a aceitação da premissa de que estes são inócuos e não apresentam consequências sérias na sua utilização irresponsável. Alguns dos exemplos são a automedicação com paracetamol, ibuprofeno, naproxeno. Para regular a utilização indevida destes constituintes o INFARMED já implementou a venda exclusiva em farmácia de alguns destes medicamentos confiando na correta dispensa por parte destas entidades.

Durante o período de confinamento verificou-se uma corrida às farmácias para garantir o stock em casa que levou a um colapso por parte dos distribuidores e um racionamento das quantidades fornecidas por utente. No sentido de mitigar esta inconformidade no fornecimento dos medicamentos quer à farmácia, quer à população foi decretado no artigo 17.º da Portaria n.º 284-A/2016 de 4 de novembro, que limita a dispensa de duas embalagens por linha de prescrição por mês assegurando a quantidade necessária para a correspondente posologia.

### **2.4.2. Medicamentos esgotados**

Em Portugal o condicionamento do preço de venda ao público de MSRM tem vindo a diminuir por decisões políticas e económicas, o que leva a discrepâncias nos preços praticados por outros países europeus (Deloitte, 2012). Estas diferenças propiciam o mercado de exportação paralela por parte dos laboratórios que racionam o fornecimento dos

medicamentos no mercado português em detrimento de outros países onde obtém resultados mais lucrativos. Igualmente os armazenistas e distribuidores exportam uma parte do seu stock para mercados onde conseguem obter maior margem comercial, ficando o mercado português limitado o que faz com que os medicamentos sejam rateados para as farmácias chegando mesmo até ao ponto de termos medicamentos esgotados.

Atualmente o INFARMED tem uma lista de medicamentos que estão sujeitos a notificação prévia ao instituto para exportação ou distribuição, sendo atualizada sempre que necessário. Este pode aplicar coimas aos armazenistas que exportem de forma ilegal de modo a minimizar ruturas e falhas de acesso aos medicamentos.

O problema que agora se vem revelando como um fator limitante é a centralização da produção das grandes indústrias farmacêuticas limitando a produção do mesmo medicamento em menos fábricas, o que implica uma rotura no mercado se uma delas apresentar algum problema (Mandim, 2019).

Nestes casos em que o medicamento não está disponível o farmacêutico e o médico têm de encontrar alternativas terapêuticas equivalentes para garantir a continuidade do tratamento dos utentes.

### **2.4.3. Locais de venda de MNSRM**

Atualmente os MNSRM podem ser vendidos fora das farmácias nos locais comumente designados de parafarmácias devido à liberalização do mercado em 2005 apresentado no Decreto-Lei n.º 134/2005 de 16 de agosto. Regra geral os locais de venda de MNSRM encontram-se inseridos nas grandes superfícies comerciais que conseguem exercer um maior poder de negociação conseguindo aplicar preços inferiores aos aplicados pelas farmácias. Esta é uma ameaça à sustentabilidade financeira das farmácias. Acrescendo ainda ao facto de contribuir para a banalização da utilização do medicamento sem o correto aconselhamento do farmacêutico. Por norma o utente quando se desloca a estes locais procura um preço mais baixo para o produto que pretende comprar, por norma este já tem definido o que quer levar, mas sem a correta confirmação da adequabilidade da sintomatologia com a terapêutica pretendida pode estar em causa a incorreta utilização do medicamento. Faz toda a diferença ser atendido por um especialista do medicamento que consegue desenvolver uma sequência de diálogo com vista a verificar a sintomatologia do utente e associar a terapêutica mais adequada ao seu quadro clínico bem como advertências que possam ser necessárias pela



conjugação com a terapêutica já adquirida pelo utente, como a terapêutica prolongada para patologias crónicas.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O culminar do meu percurso académico marcado pela situação pandémica que o SARS-CoV-2 nos impôs, foi de facto desafiante e incutiu uma responsabilidade acrescida na atuação como agente de saúde pública junto da população na farmácia Rodrigues da Silva.

O estágio em farmácia comunitária realça assim o desenvolvimento de profissionais centrados no utente e a sua inclusão em serviços de saúde diferenciados.

As lições aprendidas são muitas e refletem os conhecimentos já adquiridos durante o percurso académico, consolidando-os e aplicando-os à realidade, assim como a aquisição de novos conceitos fomentando a aprendizagem *on the job*. Demonstrando a importância da capacidade comunicativa com o utente que é determinante para o aconselhamento e acompanhamento terapêutico primando a saúde e o bem-estar do mesmo. O espírito crítico é fundamental em todas as situações do quotidiano de um farmacêutico seja no aconselhamento seja na seleção do medicamento a dispensar, cada vez mais é solicitada a capacidade de adaptabilidade a situações fora do contexto científico do medicamento como a gestão comercial e o marketing associado aos MNSR, devemos ser sempre críticos e “questionar as questões”.

Para finalizar, como juntos chegamos mais longe, o meu percurso reflete os conhecimentos e valores que me foram transmitidos por toda a equipa da farmácia Rodrigues da Silva, bem como as minhas colegas que como eu estagiaram na farmácia. Assim aproveito para deixar uma palavra de agradecimento ao Dr. Pedro Amaro, Dr. Joana Carvalho, Dr. Rui Lopes por toda a confiança em mim depositada, por todo o apoio e disponibilidade constante. A todos o meu sincero obrigado.

## 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CEDIME - **COVID-19 Farmácia Covid-19**. (2020). [Acedido a 8 set. 2020]. Disponível em: [https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/editor2/2019/WWW/campanhas/coronavirus/PlanoFC\\_v3.pdf](https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/editor2/2019/WWW/campanhas/coronavirus/PlanoFC_v3.pdf)

DELOITTE - **Exportação paralela é uma das principais causas de faltas de medicamentos em Portugal**. (2012). [Acedido a 8 set. 2020]. Disponível em: <https://www.apifarma.pt/salaimprensa/noticias/Paginas/ExpMedpt.aspx>

INFARMED – **Resumo das características do Medicamento - Movicol solução oral em saqueta**. [Acedido a 12 set. 2020]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>

INFARMED – **Resumo das características do Medicamento - Flonaze 50 microgramas/dose suspensão para pulverização nasal**. [Acedido a 12 set. 2020]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>

MANDIM, David - **Porque é que Portugal exporta tantos medicamentos - legal e ilegalmente?** – Diário de Notícias. (2019). [Acedido a 8 set. 2020]. Disponível em: <https://www.dn.pt/pais/porque-e-que-portugal-exporta-tantosmedicamentos---legal-e-ilegalmente--11069506.html>

MINISTÉRIO DA SAÚDE - **Decreto-Lei n.º 97/2015 de 1 de junho**. Diário da República. Série I, n.º 105, (2015) 3453 - 3464. [Acedido a 8 set. 2020]. Disponível em: [https://dre.pt/web/guest/pesquisa/-/search/67356991/details/normal?p\\_p\\_auth=UQ0QzFD2](https://dre.pt/web/guest/pesquisa/-/search/67356991/details/normal?p_p_auth=UQ0QzFD2)

MINISTÉRIO DA SAÚDE - **Decreto-Lei n.º 134/2005 de 16 de agosto**. Diário da República n.º 156, Série I-A (2005). [Acedido a 8 set. 2020]. Disponível em: <https://dre.pt/web/guest/pesquisa/-/search/243692/details/normal?q=Decreto-Lei+n%C2%BA%20134%2F2005+>

MINISTÉRIO DA SAÚDE - **Portaria n.º 195-C/2015 de 30 de junho**. Diário da República. Série I, n.º 125, 1º Suplemento (2015) 4542-(6) a 4542-(11). [Acedido a 8 set. 2020]. Disponível em: [https://dre.pt/web/guest/pesquisa/-/search/67644326/details/normal?p\\_p\\_auth=UQ0QzFD2](https://dre.pt/web/guest/pesquisa/-/search/67644326/details/normal?p_p_auth=UQ0QzFD2)

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Regulamentos - A Ordem dos Farmacêuticos** [Acedido a 8 set. 2020]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/a-ordem-dos-farmaceuticos/regulamentos/>

SAÚDE - **Portaria n.º 284-A/2016 de 4 de novembro**. Diário da República. Série I, n.º 212, 1º Suplemento (2016) 3908-(2) a 3908-(11). [Acedido a 8 set. 2020]. Disponível em: <https://dre.pt/web/guest/pesquisa/-/search/75660778/details/normal?!=1>

# ANEXOS

## Caso 1: Obstipação

Um senhor com aproximadamente 70 anos deslocou-se à farmácia e procurava aconselhamento pois se encontrava obstipado há mais de uma semana e que a situação já se verificava com mais frequência. Primeiramente temos de questionar sobre a medicação que está a tomar para verificar se não é um efeito secundário e também para perceber o estado clínico do utente. Este refere que faz medicação para a diabetes *mellitus* e hipercolesterolemia. Ao mesmo tempo temos de verificar os seus hábitos alimentares e o estilo de vida tentando inculcar a importância das medidas não farmacológicas. Aumentar a ingestão de alimentos ricos em fibras, beber mais água ao longo do dia, incentivar à prática de exercício físico e adotar um horário regular para a evacuação preferencialmente após uma refeição quando o intestino está mais ativo.

Dado que o utente se encontrava obstipado frequentemente recomendei Movicol® solução oral em saqueta, 1 a 3 saquetas ao longo do dia durante as 2 primeiras semanas, se necessária a utilização prolongada deve de reduzir para 1 a 2 saquetas. Este é constituído por macrogol e sais que atuam como laxantes osmóticos promovendo a captação de água para o lúmen intestinal por hiperosmolaridade amolecendo as fezes e aumentando os movimentos peristálticos.

## Caso 2: Rinite Alérgica

Um jovem com cerca de 20 anos dirigiu-se à farmácia queixando-se de congestão nasal, rinorreia comichão na zona ocular. O utente referiu que era recorrente a sintomatologia e que já tinha tomado anti-histamínicos orais. A frequência do surgimento dos sintomas era variável ao que tudo indica tratar-se de um caso típico de rinite alérgica. Nesta situação aconselhar a tentar evitar o contacto com os agentes alergénios e remeter para o médico para realizar os testes cutâneos e/ou análises ao sangue para determinar os agentes que despoletam a reação inflamatória da mucosa nasal.

Aconselhei assim o utente a iniciar o tratamento com um corticosteroide nasal como a fluticasona devendo administrar duas pulverizações em cada narina uma vez ao dia enquanto os sintomas persistirem e reduzir para uma pulverização por dia em cada narina quando os sintomas já estivessem controlados. De referir que este tratamento tem um período inicial de atuação podendo só sentir melhorias entre dois a três dias após iniciar o tratamento, após a pulverização deve de bochechar com água.

# **CAPÍTULO II**

## **Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica**

Compliance

Bluepharma - Indústria Farmacêutica S.A.

# ABREVIATURAS

AC - Autoridade Competente

AIM - Autorização de Introdução no Mercado

API - *Active Pharmaceutical Ingredient*

CESP - *Common European Submission Portal*

CoS/CEP - *Certificates of Suitability*

CTD - *Common Technical Document*

DMF - *Drug Master File*

DS - *Drug Substance*

eAF - *Electronic Application Form*

eCTD - *Electronic Common Technical Document*

EDQM - *European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare*

EMA - *European Medicines Agency*

FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

ICH - *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*

MA - *Marketing Authorisation*

MAH - *Marketing Authorisation Holder*

OOS - *Out-of-Specification*

PA - Produto Acabado

Ph. Eur. - *European Pharmacopoeia*

QM - *Quality Management /Gestão da Qualidade*

QPC - *Qualidade do Produto e Compliance*

RA - *Regulatory Affairs/ Assuntos Regulamentares*

SA - Substância Ativa

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

SOP - *Standard Operating Procedure*

SWOT - *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

# I. NOTA INTRODUTÓRIA

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas ministrado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra contempla no seu plano de estudos a realização de um estágio curricular na área do medicamento no quinto ano. Tendo em conta a multidisciplinaridade que um futuro profissional deve de adquirir ao longo do seu percurso, nada melhor do que adquirir experiência em diferentes áreas, como tal realizei um estágio curricular em indústria farmacêutica na Bluepharma – Indústria Farmacêutica S.A. no departamento de Compliance.

O estágio decorreu entre 18 de maio e 31 de julho, sob a orientação da Dra. Ana Sofia F. Silva.

O presente relatório de estágio está estruturado na forma de análise SWOT sendo feita a avaliação do ambiente interno em pontos fortes (*Strengths*) e pontos fracos (*Weaknesses*) e a análise do ambiente externo em oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*).

## 2. BLUEPHARMA – HISTÓRIA E MISSÃO

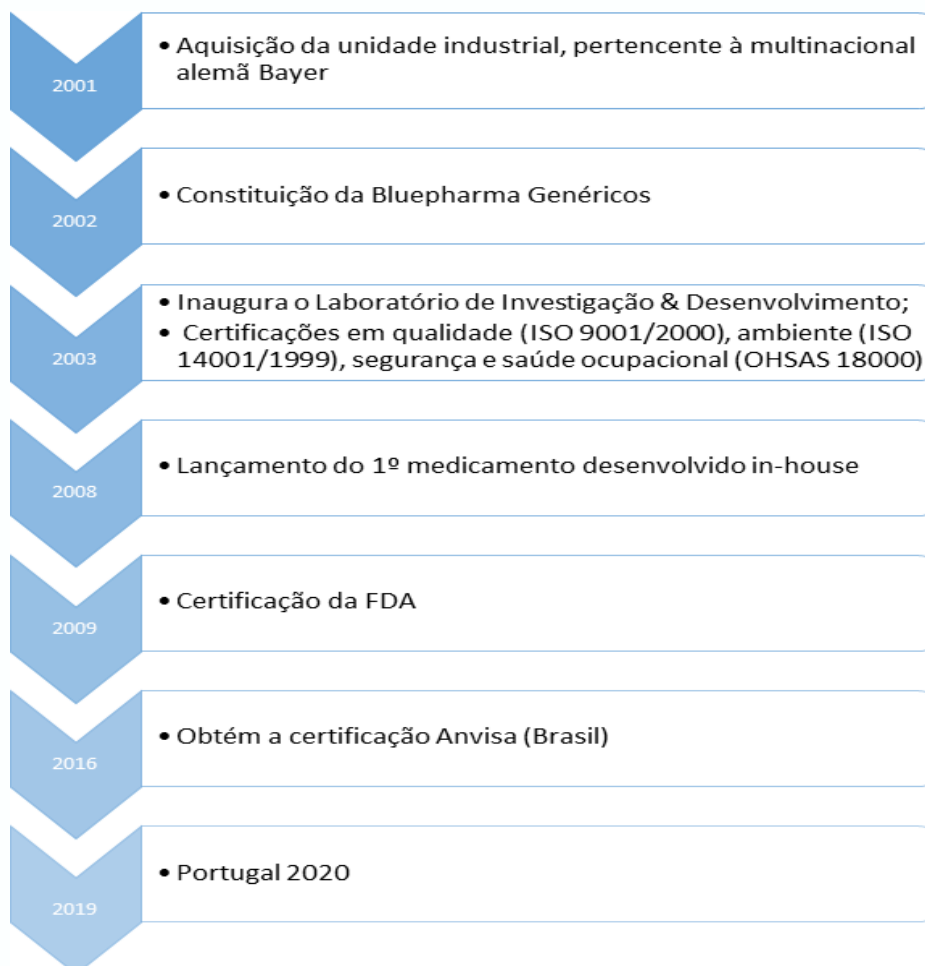
A Bluepharma é uma empresa Farmacêutica, de capitais portugueses, com sede em São Martinho do Bispo, Coimbra. Iniciou a sua atividade em fevereiro de 2001, na sequência da aquisição da unidade industrial pertencente à multinacional alemã Bayer (Bluepharma, [s.d.]).

A sua atividade decorre em três áreas distintas interligadas na cadeia de valor do medicamento:

- Investigação, desenvolvimento e registo de medicamentos;
- Produção de medicamentos próprios e para terceiros, essencialmente formas farmacêuticas sólidas de libertação imediata e modificada (maioritariamente, cápsulas e comprimidos), para além da produção de algumas formas farmacêuticas modificadas, tais como filmes e sprays orais;
- Comercialização de medicamentos genéricos.

Focados no desenvolvimento próprio, nacional e internacional a empresa almeja a melhoria contínua em toda a sua estrutura funcional e de negócio. Com estes valores a Bluepharma delineou o projeto “Bluepharma Acelera 2030” em que pretende a criação de uma nova unidade industrial, em Eiras para a produção de medicamentos que incorporam substâncias ativas de elevada atividade farmacológica, assim como a melhoria dos processos

de produção a serem desenvolvidos numa cultura de zero defeitos. Esta expansão pretende dar resposta às atividades de investigação e desenvolvimento *in-house*, sendo um dos pontos fortes e de maior relevância da empresa.



**Figura 1** - Sequência temporal da história da Bluepharma.

### 3. COMPLIANCE – DEFINIÇÃO E ENQUADRAMENTO

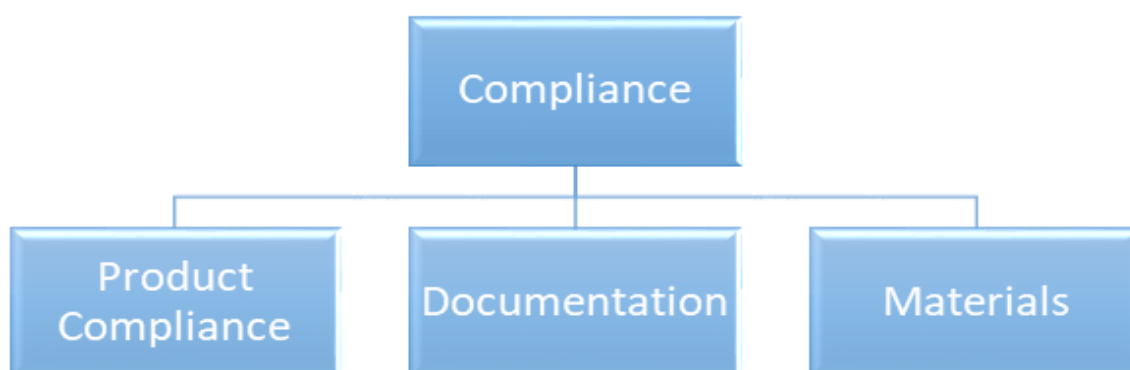
O conceito Compliance deriva da ação *comply* em inglês, que significa estar em conformidade. Transversalmente em qualquer área onde se pretenda aplicar este conceito, o intuito é refletir a ética e a transparência dos procedimentos realizados (Ignatti, 2020).

Todas as entidades envolvidas no desenvolvimento, *marketing*, fabricação e distribuição de medicamentos são responsáveis por fazer cumprir todas as normas regulamentares e *guidelines* apresentadas pelas autoridades competentes (AC) nacionais e internacionais,

consoante o processo de registo (European Medicines Agency, [s.d.]; Global Compliance Panel, 2018).

O que se pretende com a adoção deste conceito é identificar, minimizar e eliminar riscos em todos os estádios do ciclo de vida do medicamento e do seu processo regulamentar (Global Compliance Panel, 2018). O cumprimento com os requisitos regulamentares é a melhor forma de garantir a eficácia e segurança do medicamento. O bom funcionamento deste setor tem um impacto global na confiança dos clientes e colaboradores na sua visão da empresa, melhora a qualidade dos serviços prestados e diminui o custo associado a erros durante o ciclo de vida do produto, com vista à proteção do doente numa perspetiva da aquisição de medicamentos com elevada qualidade, segurança e terapêutica eficaz (FDA, 2020).

### 3.1. Departamento de Compliance na Bluepharma



**Figura 2** - Estrutura do departamento de Compliance.

Este departamento resulta de uma recente reestruturação da estrutura da empresa, no início de 2020, no sentido de reforçar os valores de compliance, excelência, eficiência e satisfação do cliente. A equipa que estrutura o departamento foi estrategicamente selecionada da qual fazem parte colaboradores do departamento de Assuntos Regulamentares e do departamento de Qualidade do Produto e Compliance. Este novo departamento garante que as atividades realizadas na empresa cumprem com a documentação submetida e aprovada pela AC. Deste modo o departamento gere todo o ciclo de vida pós-autorização de introdução no mercado (AIM) do medicamento, para garantir a conformidade, qualidade e segurança dos medicamentos.

A Compliance é assim um departamento de suporte à empresa, otimizando e garantindo a concordância/conformidade entre vários departamentos chave da empresa. O

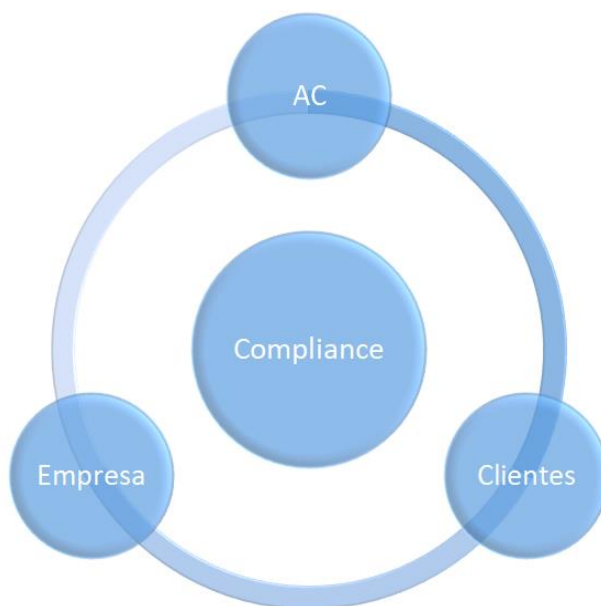


cliente final é sempre o titular de AIM sendo estabelecida uma estreita relação entre os clientes, AC e a empresa.

Ao integrar este departamento fui alocada à equipa de Compliance do produto.

Funções da equipa de Compliance do Produto:

- Controle de dossier do medicamento;
- Monitorização de CEPs e DMFs;
- Avaliação de impacto regulamentar;
- Alterações regulamentares – preparação, submissão e monitorização (novas fontes de API, alterações decorrentes de desvios de fábrica, alterações decorrentes de qualidade e de resultados de estabilidade OOS);
- Acompanhamento de Transferências de Tecnologia.



**Figura 3** - Posicionamento do departamento Compliance.

## 4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

### 4.1. Atualização de CEPs

O *Certificate of Suitability* (CoS/CEP) é uma garantia de que o Princípio Ativo ou *Active Pharmaceutical Ingredient* (API) fornecido por determinado fabricante, pode ser corretamente controlada e a sua pureza química e microbiológica é assegurada pelos testes que constam na Farmacopeia Europeia (*European Pharmacopoeia* (Ph. Eur.)). Isto é, a qualidade da substância corresponde à qualidade definida pela Farmacopeia (ECA Academy, 2018; EDQM, 2018).

A entidade que emite este certificado é o *European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare* (EDQM) que garante que o processo de síntese de determinado fabricante origina um determinado API e que a sua qualidade pode ser verificada através dos métodos descritos na Ph. Eur.. Este certificado é submetido à AC e é remetido por várias secções na estrutura *Common Technical Document* (CTD).

#### - Monitorização das versões de CEP para cada API

Assim para controlar a atualização de versões do CEP de cada princípio ativo utilizado na produção do medicamento é realizado uma consulta na base de dados do EDQM.

Quando a autoridade onde se pretende comercializar o medicamento não reconhece a credibilidade de um CEP, é submetido na secção 3.2.S *Drug Substance* (DS) dentro da estrutura CTD, o chamado *Drug Master File* (DMF). Este documento apresenta toda a informação como constituintes, processo de síntese, etc. Mas apenas uma parte, que é designada “parte aberta” é disponibilizada ao fabricante de produto acabado. Nestes casos o levantamento das versões mais recentes de que cada fabricante dispõe, tem de ser realizado individualmente.

### 4.2. Submissão de uma alteração

No seguimento de novas revisões ou versões de CEP estas têm de ser submetidas às autoridades para que se possa em conformidade, utilizar o API que é produzido segundo a nova revisão/versão de CEP.

Quando a nova revisão/versão diz respeito a uma alteração *minor* tipo IA “*Do and tell*” pode ser submetida após implementação, mas quando se verifica que a alteração pode ter impacto na qualidade do produto este passa a IB “*Tell and do*” onde se submete à autoridade e tem de se aguardar pela aprovação para poder ser implementada.

No caso de uma nova versão de CEP de um fabricante já utilizado corresponde a uma alteração do tipo IA segundo a *guideline* da *European Medicines Agency* (EMA) (Official Journal of the European Union, 2013).

No processo de submissão são necessárias seguir diferentes etapas. A base de dados eSubmission, reúne a informação necessária para facilitar o processo de submissão da informação regulamentar às autoridades competentes.

O *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) desenvolveu o *Common Technical Document*, que descreve a organização dos módulos, secções e documentos necessários para a atribuição de uma AIM que permite a comercialização de determinado medicamento no território aprovado (ICH, 2020; ICH M2 EWG, 2008). O ICH desenvolveu o modelo padrão de submissão eletrónico designado *electronic Common Technical Document* (eCTD) este sistema permite a transferência de informação entre a indústria e as AC, tendo em conta a submissão para nova AIM, revisão, gestão do ciclo de vida do medicamento e arquivo do processo regulamentar (EMA, [s.d.]).

- "Harmonised Technical Guidance for eCTD Submissions in the EU" v4.0, é um documento guia que fornece suporte às entidades farmacêuticas que pretendem submeter informação regulamentar às AC (Human Harmonisation Maintenance Group, 2016).

- Volume 2B – "Notice to Applicants Presentation and content of the dossier CTD", este é um dos volumes que consta do EudraLex que é uma "coleção das regras e regulamentos que regem os medicamentos na EU". Este volume é destinado aos MA *Applicants* e contém uma lista com as *guidelines* regulamentares referentes ao processo e requisitos regulamentares de submissão de uma AIM e da sua manutenção (*life cycle*) (European Commission, 2008).

- "Practical User Guide for Electronic Application Forms (eAF) for human and veterinary medicinal products in the EU", este documento fornece suporte ao preenchimento do formulário requerido no processo de submissão (eAF Sub-Group on Guidance, 2018).

- Common European Submission Portal (CESP) é uma plataforma que permite de forma simples e segura a troca de informação entre os MA *Applicants* e as AC. Este sistema facilita o contacto entre o aplicante e todas as entidades regulamentares envolvidas no processo entre diferentes países (HMA, [s.d.]).

- Algumas autoridades de alguns países apresentam requisitos específicos para a estruturação e submissão do módulo I. "*EU Module I Specification*" v1.4.1 (EMA, 2011), apresenta o formato que deve ser cumprido no caso da EU-EMA.

No caso de Portugal aquando da submissão de informação regulamentar para além da submissão no CESP é necessária a submissão na Plataforma de Submissão de Pedidos de Alteração do Sistema de Gestão de Medicamentos de Uso Humano (SMUH-ALTER) do INFARMED.

O INFARMED disponibiliza um documento onde apresenta as “Instruções aos requerentes sobre submissão eletrónica de pedidos de alteração, renovação e transferência de titular de AIM” (Infarmed, [s.d.]). O “Manual de utilizador externo SMUH-ALTER (PT)” - versão 2, agosto 2013 (Infarmed, 2013), apresenta passo a passo as ações a serem tomadas no preenchimento do formulário do Pedido de Alteração do SMUH.

### **4.3. Workplan**

Estruturalmente a empresa necessita de uma base de dados partilhada, onde todos os colaboradores têm acesso à informação aí disponibilizada e necessária para as suas atividades. Na Bluepharma este sistema interno de partilha e armazenamento de dados designa-se SharePoint®. Este sistema permite um fácil e rápido acesso à informação por qualquer colaborador devidamente acreditado pelos responsáveis de cada pasta no sistema.

Simultaneamente encontra-se em construção uma base de dados de produto que consiste num registo com as moléculas e todos os clientes, onde a informação chave relevante será disponibilizada, como país aprovado, dosagem, prazo de validade, fonte de API, número do processo, que deste modo está apresentada de forma simplificada, sendo consultada no dossier do medicamento aprovado para cada cliente.

### **4.4. Atualização do dossier do medicamento**

No decurso do surgimento da necessidade de atualização da secção 3.2.P.8 - *Stability* de um produto tive a oportunidade de contactar com os documentos internos de estudos de estabilidade realizados no departamento de Estabilidades da empresa, do qual resulta a análise e definição do prazo de validade para o produto acabado. Neste sentido, esta pode ser atualizada de acordo com os resultados obtidos, e a secção do dossier do medicamento ser atualizada de acordo com os dados gerados e apresentados.

#### **4.5. Organização do módulo 3 do dossier formato CTD**

O processo de registo de um medicamento pode ser realizado de diferentes modos, originando o desenvolvimento do dossier do medicamento que depois dará origem a uma AIM. No caso de uma indústria farmacêutica como a Bluepharma onde esta desenvolve internamente produtos (designados de BLUExx por uma questão de confidencialidade) e estes dão origem a um dossier que posteriormente será submetido às autoridades para comercialização, o mesmo pode ser desenvolvido em parceria com outra entidade que cogere a pasta de clientes aprovados.

A empresa pode também ser contratada por um cliente e passar a ser um dos fabricantes do produto acabado, tendo de estar incluída no do medicamento como fabricante, na secção 3.2p3.1, do módulo 3 de Qualidade. Este contrato é designado Licenciamento. Para tal é necessária a partilha da informação regulamentar que permita a implementação da produção do produto acabado na fábrica. Para isso é necessário que o MAH disponibilize idealmente módulo 3 secção p onde se encontra a informação relativa à qualidade das substâncias ativas e farmacêuticas e do produto acabado. Nesta situação o MAH pode enviar apenas algumas das secções sem as quais não é possível à indústria farmacêutica gerar internamente a documentação necessária para a implementação da produção do medicamento na fábrica e à realização dos testes relativos às especificações necessárias para a libertação dos lotes, quer para a SA quer para o PA. As secções que neste caso o MAH disponibiliza tem de ser as mais recentes e aprovadas pela AC para que os métodos implementados pelo fabricante estejam em conformidade com o aprovado para o cliente pela AC.

No meu estágio tive a oportunidade de consolidar o módulo 3 de um medicamento que neste caso foi transferida a sua produção para a Bluepharma, e consistiu na organização das versões de cada secção por cliente, isto é, a mesma secção pode ter várias versões que vão sendo atualizadas consoante o surgimento da necessidade. Cada cliente pode ter uma secção aprovada e podem não corresponder entre cada cliente, tendo de ser acompanhado individualmente cada cliente e atualizada a secção correspondente.

## 5. ANÁLISE SWOT



*Figura 5 - Resumo esquemático da análise SWOT relativa ao estágio na Bluepharma.*

### 5.1. Pontos Fortes

#### 5.1.1. Autonomia nas atividades desenvolvidas

Durante o estágio tive a oportunidade de participar e acompanhar diferentes procedimentos a ter, na gestão do dossier do medicamento aprovado. No desempenho destas tarefas que me foram atribuídas tive total confiança dos colegas do departamento e que de forma autónoma estimularam a versatilidade e a aplicação dos conhecimentos adquiridos ao longo do meu percurso académico, bem como o espírito de iniciativa e a proatividade do setor de Compliance que está em constante atualização contribuindo assim para o meu desenvolvimento profissional.

#### 5.1.2. Espírito de equipa

O departamento da Compliance é composto por uma equipa jovem, colaborativa e com um enorme sentido de entreatajuda. A minha integração neste departamento foi de forma espontânea e no término do estágio ficou um sentido de amizade e saudade. Toda a disponibilidade e colaboração dos colegas contribuiu para uma adaptação à realidade

profissional gradual. A prontidão por parte dos colegas em explicar o funcionamento dos diferentes departamentos e da envolvente de uma indústria farmacêutica, permitiu a visita a outros setores e departamentos, acrescentando um enquadramento da área farmacêutica no universo da indústria farmacêutica.

### **5.1.3. Plano de formação**

A adaptação de novos colaboradores na Bluepharma inicia-se com uma exposição inicial da empresa por parte do departamento de Recursos Humanos e com a realização de uma visita pelas instalações, que neste último ponto, não foi realizada devido às circunstâncias vividas no momento. Inicialmente tivemos acesso a formações de índole transversal a todos os departamentos com o intuito de dar a conhecer o funcionamento e as políticas gerais da empresa. Adicionalmente foram complementadas com as designadas SOP – *Standard Operating Procedure*, que são documentos explicativos e demonstrativos de diferentes tarefas dirigidas para cada departamento.

No departamento da Compliance como é recente, várias atividades que anteriormente estavam descritas nas SOPs e alocadas a outros departamentos como o QM – *Gestão da Qualidade*, QPC – *Qualidade do Produto e Compliance* e RA – *Regulatory Affairs* ainda se encontram com a antiga nomenclatura e atualmente fazem parte das atividades deste departamento.

O investimento por parte da Bluepharma na contínua formação dos colaboradores é notório e diferenciador num setor que está em constante evolução, sendo um dos principais pontos fortes da empresa a sua aposta no desenvolvimento pessoal dos colaboradores.

## **5.2. Pontos Fracos**

### **5.2.1. Duração do estágio**

O período de estágio de 3 meses num setor como a indústria farmacêutica não permite atingir experiência profissional suficiente atendendo à vasta variedade de departamentos e áreas nos quais um farmacêutico pode desenvolver as suas competências. Esta oportunidade tem de ser vista como um período de aquisição de conhecimento relativamente ao funcionamento e gestão dos diferentes setores do medicamento nos quais temos oportunidade de estagiar.

## **5.2.2. Diferentes departamentos**

A indústria assenta na interdependência e de uma gestão coordenada de diferentes departamentos e áreas com o objetivo de desenvolver um produto final, neste caso um medicamento, garantindo e assegurando a conformidade e a segurança do mesmo ao consumidor final.

Durante o estágio não é possível a rotação por outros departamentos o que reduz a experiência e o contacto com outras atividades que são desenvolvidas por farmacêuticos noutros departamentos. Simultaneamente permite efetivar o trabalho desenvolvido junto do departamento e consolidar as tarefas atribuídas. Deste modo é possível analisar o percurso e ver os resultados.

## **5.3. Oportunidades**

### **5.3.1. Estágio curricular na área do medicamento**

A Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra permite aos seus alunos complementar a experiência curricular ao promover o contacto com diferentes entidades ligadas à área do medicamento, para além do estágio em farmácia comunitária exigido para a conclusão do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Neste sentido o estágio representou o primeiro contacto com a indústria farmacêutica a nível profissional, permitindo a aplicação e adaptação dos conhecimentos adquiridos ao longo do percurso académico nas unidades curriculares de “Assuntos Regulamentares do Medicamento” e “Gestão e Garantia de Qualidade”, principalmente através da aquisição das ferramentas que permitem saber onde procurar a informação e como a aplicar e contextualizar. Estas valências permitem diferenciar os alunos da FFUC comparativamente a outras instituições do país, permitindo um percurso académico rico em oportunidades refletindo-se na formação de profissionais capazes e adaptados ao mercado de trabalho.

### **5.3.2. Novo departamento**

O departamento da Compliance na Bluepharma foi recentemente criado e os colaboradores que integram a equipa advêm de dois departamentos já existentes. Este foi criado para permitir a centralização de atividades de Compliance, anteriormente dispersas,



com vista a reforçar os valores de compliance, excelência, eficiência e satisfação do cliente. O facto de integrar um novo departamento ainda em adaptação e crescimento, permitiu o acompanhamento da sequência de gestão interna, entre os diferentes departamentos e a implementação de fluxos de trabalho. Este é um período que permite a abertura para implementar e adaptar o sistema de modo a melhorar e garantir a qualidade e conformidade de todo o ciclo de vida do medicamento.

### **5.3.3. Teletrabalho**

Em virtude dos tempos atuais em que nos deparamos com a exigência de um estado global de pandemia foram adaptadas as ferramentas e o modo de trabalho para que seja possível continuar a lutar e prevalecer face ao inimigo invisível o vírus SARS-CoV-2. A Bluepharma sendo um setor essencial e estratégico no âmbito da saúde pública nunca parou a sua produção e optou por adotar o teletrabalho nos casos possíveis. Ao iniciar o meu estágio, este foi presencial na empresa para permitir o meu acompanhamento e foi adotada a estratégia de os restantes colaboradores do departamento realizarem uma rotação ao longo da semana de modo a cumprir com as normas implementadas pela Bluepharma para a prevenção de contactos no local de trabalho. Na minha perspetiva o teletrabalho permitiu a adoção e implementação de novas ferramentas de trabalho como é o caso da plataforma *Microsoft Teams* que a meu ver serão implementadas nas empresas bem como o teletrabalho nos casos possíveis.

## **5.4. Ameaças**

### **5.4.1. Sobrecarga de atividades**

A exigência do cumprimento de parâmetros regulamentares e de qualidade é transversal em toda a indústria farmacêutica sendo um dos setores mais fiscalizado do mercado. A estas exigências acrescem ainda parâmetros que são acordados entre as entidades que colaboram no desenvolvimento do negócio e os próprios clientes, isto é, entidades que introduzem um dado medicamento no mercado com base num dossier do medicamento aprovado, que é submetido à autoridade regulamentar do cliente. A exigência de uma estreita relação entre as partes é fulcral para o alinhamento de toda a atividade desenvolvida pela Bluepharma quer seja esta o MAH ou o fabricante dependendo do tipo de negócio estabelecido.

Todos os departamentos da empresa trabalham com o mesmo foco, garantir a qualidade e segurança do medicamento. A harmonia necessária para garantir a conformidade do produto final, depende de todos os envolvidos e está limitada pela comunicação interdepartamental e entre a empresa e os clientes ou a empresa que intermedia a relação com o cliente final. Este fator limitante afeta a própria libertação de lote na fábrica devido a prazos de aprovações de exigências regulamentares e afeta também a carga documental gerada internamente devido a constantes alterações que são necessárias, quer no setor de produção e embalagem quer no setor de análises laboratoriais.

## 6. Considerações Finais

A indústria farmacêutica apresenta-se como uma área importantíssima no panorama global como tal é um setor em constante mudança e que se encontra intrinsecamente ligada à evolução de paradigmas como a evolução tecnológica e científica, valores sociais e económicos. O estágio na Bluepharma foi uma experiência imensamente enriquecedora e desafiante, permitiu a aquisição de uma noção mais alargada e completa da dinâmica e estrutura de uma indústria farmacêutica. Este estágio curricular foi o primeiro contacto com este setor e que me proporcionou o enquadramento do farmacêutico neste mercado de trabalho, a formação profissional contínua exigida pela multiplicidade de funções, os valores pelos quais se deve mover e que fazem parte dos pilares da empresa.

Tenho a agradecer toda esta aprendizagem e crescimento pessoal que me proporcionaram e a potencialização de capacidades e competências que farão parte do meu percurso futuro.

Muito obrigada a toda a equipa Compliance pela disponibilidade e orientação durante o meu estágio e pelo espírito incrível que vos caracteriza. A todos o meu sincero obrigado.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLUEPHARMA - **Bluepharma**. [Acedido a 9 set. 2020]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/>

EAF SUB-GROUP ON GUIDANCE - **Practical User Guide for Electronic Application Forms (eAF) for human and veterinary medicinal products in the EU**. (2018). [Acedido a 9 set. 2020]. Disponível em: [http://esubmission.ema.europa.eu/eaf/docs/Practical%20user%20guide%20for%20electronic%20Application%20Forms%20\(eAF\)%20for%20huma%20and%20veterinary%20products%20in%20the%20EU\\_v1.7.1.pdf](http://esubmission.ema.europa.eu/eaf/docs/Practical%20user%20guide%20for%20electronic%20Application%20Forms%20(eAF)%20for%20huma%20and%20veterinary%20products%20in%20the%20EU_v1.7.1.pdf)

ECA ACADEMY - **What information is included in a CEP? - ECA Academy**. (2018). [Acedido a 9 set. 2020]. Disponível em: <https://www.gmp-compliance.org/gmp-news/what-information-is-included-in-a-cep>

EDQM - **How to read a CEP**. (2018). [Acedido a 9 set. 2020]. Disponível em: <https://www.edqm.eu/sites/default/files/guideline-cep-how-to-read-a-cep-may2018.pdf>

EMA - **eSubmission: Projects**. [Acedido a 9 set. 2020]. Disponível em: <http://esubmission.ema.europa.eu/ectd/index.html>

EMA - **EU Module I Specification**. (2011).[Acedido a 9 set. 2020]. Disponível em: [http://esubmission.ema.europa.eu/eumodule1/docs/EU%20M1%201.4.1/EU%20M1%20v141\\_Spec%20\\_Nov2011\\_FINAL.pdf](http://esubmission.ema.europa.eu/eumodule1/docs/EU%20M1%201.4.1/EU%20M1%20v141_Spec%20_Nov2011_FINAL.pdf)

EUROPEAN COMMISSION - **Notice to Applicants Medicinal products for human use**. 2008. [Acedido a 9 set. 2020]. Disponível em: [https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-2/b/update\\_200805/ctd\\_05-2008\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-2/b/update_200805/ctd_05-2008_en.pdf)

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Compliance: Overview | European Medicines Agency**. [Acedido a 9 set. 2020]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/compliance-overview>

FDA - **Office of Compliance | FDA**. (2020). [Acedido a 9 set. 2020]. Disponível em: <https://www.fda.gov/about-fda/center-drug-evaluation-and-research-cder/office-compliance>

GLOBAL COMPLIANCE PANEL - **What is Regulatory Compliance | How Importance for Industries**. (2018). [Acedido a 9 set. 2020]. Disponível em: <https://www.gcplearning.com/blog/why-regulatory-compliance-requirements-importance>

HMA, Common European Submission Portal - **Common European Submission Portal**. [Acedido a 9 set. 2020]. Disponível em: <https://cesportal.hma.eu/Account/Login?ReturnUrl=%2F>

HUMAN HARMONISATION MAINTENANCE GROUP - **Harmonised Technical Guidance for eCTD Submissions in the EU**. (2016). [Acedido a 9 set. 2020]. Disponível em: [http://esubmission.ema.europa.eu/tiges/docs/eCTD%20Guidance %20v4%200-20160422-final.pdf](http://esubmission.ema.europa.eu/tiges/docs/eCTD%20Guidance%20v4%200-20160422-final.pdf)

ICH - **ICH Official web site: ICH**. (2020). [Acedido a 9 set. 2020]. Disponível em: <https://www.ich.org/page/ich-electronic-common-technical-document-ectd-v322specification-and-related-files>

ICH M2 EWG - **Electronic Common Technical Document Specification**. (2008). [Acedido a 9 set. 2020]. Disponível em: [https://admin.ich.org/sites/default/files/inline-files/eCTD\\_Specification\\_v3\\_2\\_2\\_0.pdf](https://admin.ich.org/sites/default/files/inline-files/eCTD_Specification_v3_2_2_0.pdf)

IGNATTI, Adriano - **Tudo que você precisa saber sobre compliance**. (2020). [Acedido a 9 set. 2020]. Disponível em: <https://blog.cedrotech.com/tudo-sobre-compliance/>

INFARMED - **Instruções aos requerentes sobre submissão eletrónica de pedidos de alteração, renovação e transferência de titular de AIM**. [Acedido a 9 set. 2020]. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/1888816/Instru%C3%A7%C3%B5es+aos+requerentes+SMUHALTER+Janeiro2017.pdf/f2662fc9-7f1a-4516-a00071913b8f58fa>

INFARMED - **Manual do Utilizador Externo SMUH-ALTER**. (2013). [Acedido a 9 set. 2020]. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/SMUH-ALTER-Externo-Manual-Utilizador-PT-Versao-2-Agosto2013.pdf/9b502d4e-c0f7-4db3-a297d1237e4727d2?version=1.0>

OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION - **Guidelines on the details of the various categories of variations**. (2013). [Acedido a 9 set. 2020]. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2013:223:FULL:EN:PDF>

## **CAPÍTULO III**

### **Monografia**

“Vírus oncolíticos a nova abordagem à terapêutica oncológica”

## ABSTRACT

Oncolytic viruses are living and replicative agents that are administered in humans to infect cancer cells. Resulting from the infection we may have cell death due to viral replication and/or due to elimination by the immune system. The wide variety of viruses represents an endless opportunity for possible genetically modified combinations of oncolytic viruses aiming at improving their therapeutic effects in oncology. This review exposes a comprehensive selection of some of the most frequent genetic modifications that have been used in the development of oncolytic viruses. The application of this therapy in clinical trials has shown promising results for its implementation as a complement in the fight against cancer. Despite numerous advances in cancer research, the need for effective and selective therapy remains the golden goal for the patient. That is why oncolytic viruses have raised the interest and may fulfill the needs that exist today in cancer therapy.

**Keywords:** oncolytic viruses, cancer, genetic engineering, immunotherapy.

## RESUMO

Vírus oncolíticos são agentes vivos e replicativos que são administrados em humanos com o intuito de infectar as células cancerígenas. Resultante da infecção podemos ter a morte celular devido à replicação viral e/ou devido à eliminação pelo sistema imunológico. A grande variedade de vírus representa uma oportunidade infinita de possíveis combinações de vírus oncolíticos geneticamente modificados. Nesta revisão é apresentada uma abrangente seleção de algumas das modificações genéticas que têm sido empregues no desenvolvimento de vírus oncolíticos para fins terapêuticos contra o cancro. A aplicação desta terapêutica em ensaios clínicos tem demonstrado resultados promissores à sua implementação como complemento à terapêutica contra o cancro. Apesar de inúmeros avanços da investigação na área do cancro, a necessidade de uma terapêutica eficaz e seletiva permanece como o objetivo de ouro para o doente. Razão pela qual os vírus oncolíticos despertaram o interesse, podendo colmatar as necessidades existentes atualmente na terapêutica contra o cancro.

**Palavras-chave:** vírus oncolíticos, cancro, engenharia genética, imunoterapia.

# ABREVIATURAS

APC - *Antigen-presenting cells*

B7-1 - *Co-stimulatory molecule B7-1*

Bcl-xl - *B-cell lymphoma-extra large*

CCL5 - *CC chemokine ligand 5*

CD - *Cytosine deaminase*

CD155 - *Cluster of differentiation 155 or poliovirus receptor*

CD40L - *Ligand CD40*

CD46 - *Cluster of differentiation 46 or complement regulatory protein*

CTLA- 4 - *Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*

DAMPs - *Damage-associated molecular patterns(s)*

FCUI - *Protein Cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase fusion protein*

GM-CSF - *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

HER2 - *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*

HIF-1 $\alpha$  - *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*

HSV - *Herpes simplex virus*

hTERT - *Human telomerase reverse transcriptase*

HVEM - *Herpes virus entry mediator*

ICAM-1 - *Intercellular adhesion molecule 1*

ICD - *Immunogenic cell death*

INF - *Interferon*

LFA-3 - *Lymphocyte function-associated antigen 3*

MHCI - *Major histocompatibility complex 1*

miRNA - *MicroRNA*

p53 - *Tumor protein p53*

PDL-1 - *Programmed death-ligand 1*

PKR - *Protein kinase R*

pRb - *Retinoblastoma protein*

PSA - *Prostate specific antigen*



PVA - *Polyvinyl alcohol*

Ras-Mapk - *Mitogen-activated protein kinase signal pathway*

RR - *Ribonucleotide reductase*

SI - *Sistema inmunológico*

TAAAs - *Tumor-associated antigens*

TAMs - *Tumor-associated macrophages*

Th1 - *T helper 1*

TK - *Thymidine kinase*

TME - *Tumor microenvironment*

TRAIL - *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*

TVO - *Terapia viral oncolítica*

VEGF - *Vascular endothelial growth factor*

VEGI - *Vascular endothelial growth factor inhibitor*

VO - *Virus oncolíticos*

4-1BBL - *Ligand 4-1BB*

# I. INTRODUÇÃO

Na atualidade, o cancro é uma das maiores ameaças à saúde pública segundo a Organização Mundial de Saúde, o qual se apresenta como a segunda principal causa de morte no mundo. A terapia viral oncolítica (TVO) advém da necessidade de alternativas mais eficazes e que possam ser direcionadas especificamente às células alvo, minimizando os efeitos secundários existentes na atual terapêutica contra o cancro (WHO, 2018).

Os primeiros casos relatados, em que se refere uma regressão tumoral devido a uma infeção viral adquirida naturalmente, remontam ao início do século XIX. A maioria destes casos eram doentes que sofriam de neoplasias hematológicas como leucemia e linfoma, que provocavam a diminuição da capacidade de defesa do organismo. Sendo verificada uma remissão de curta duração, geralmente um ou dois meses antes do estado clínico se agravar (Kelly e Russell, 2007). Foi assim que os vírus despertaram o interesse como possível agente terapêutico no cancro. Nesta época ainda eram desconhecidas as consequências de ensaios clínicos massivos e sem controle algum na segurança dos participantes. Centenas de doentes foram inoculados com preparações impuras contendo vírus humanos ou de origem animal de modo a transmitir a infeção. Foram utilizados fluidos biológicos infetados administrados por inúmeras vias (Russell, Peng e Bell, 2012). Na maioria dos casos os vírus eram eliminados pelo sistema imunológico do hospedeiro e não chegavam a ter impacto na massa tumoral, mas em algumas situações foi observada a redução das massas tumorais, geralmente em doentes com um comprometimento imunológico, que acabavam por morrer devido à infeção se espalhar até aos tecidos normais (Russell, Peng e Bell, 2012).

Nas décadas de 1950 e 1960 houve um desenvolvimento e uma explosão de conhecimento na área da ciência. O desenvolvimento de sistemas de cultura de células e tecidos permitiu o estudo dos vírus ex. vivo, o que permitiu a expansão do conhecimento e caracterização destes micro-organismos (Kelly e Russell, 2007).

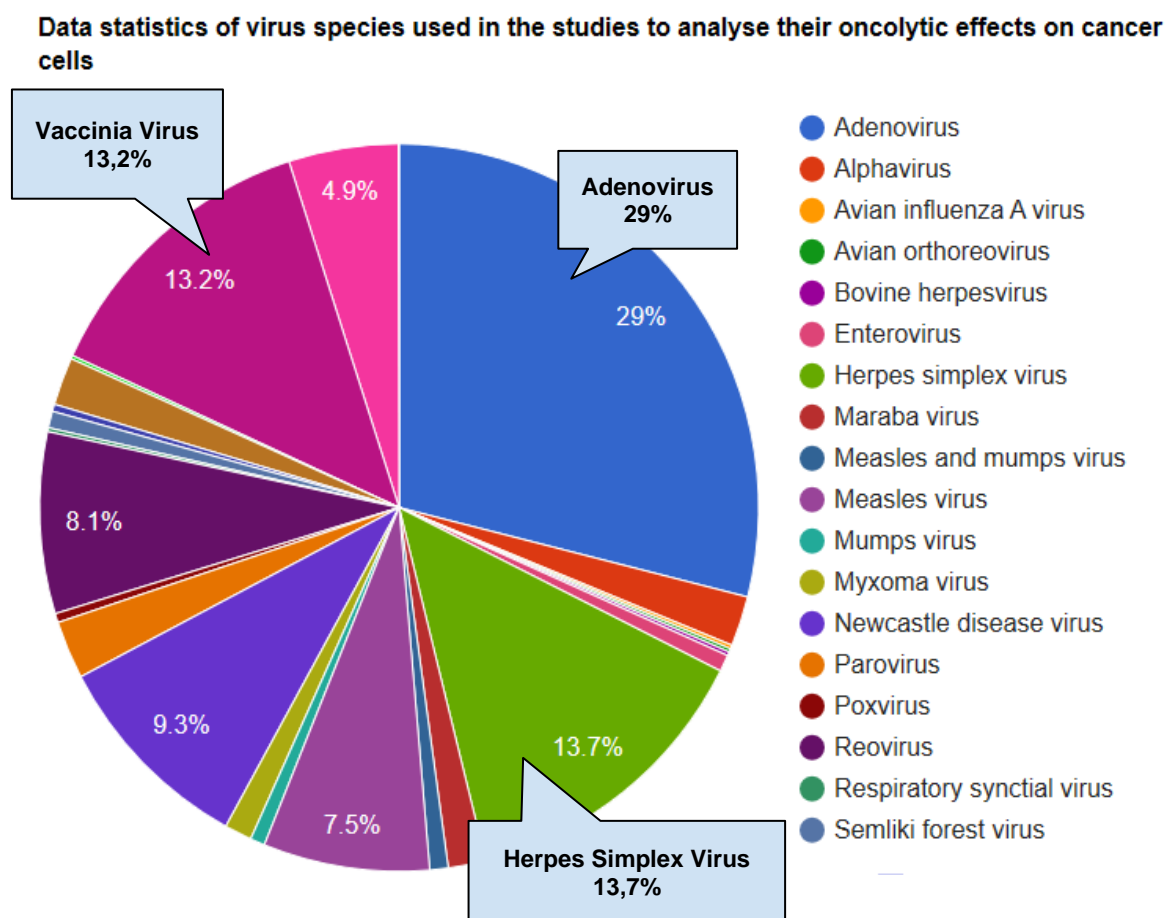
Foram inúmeras as tentativas empregues por investigadores para aumentar a seletividade dos vírus para infetar as células tumorais, mas os resultados foram insuficientes e acabou por ser uma área que foi posta de lado com o surgimento de novas tecnologias na terapêutica do cancro como a radioterapia (Kelly e Russell, 2007). Mais tarde nos anos 80, com o desenvolvimento da engenharia genética é possível alcançar uma nova perspetiva sobre o desenvolvimento de vírus oncolíticos (VO) e surge novamente o interesse na área (Kelly e Russell, 2007).

A versão simplificada sobre o mecanismo de ação dos VO é que estes são estirpes virais competentes para replicação que infetam e provocam a lise de células cancerígenas (Jayawardena *et al.*, 2020). Mas estes vírus têm um objetivo para além da destruição das massas tumorais. A longo prazo têm o potencial de criar imunidade duradoura capaz de prevenir metástases e recidivas (Marelli *et al.*, 2018). O microambiente tumoral (TME) é a zona circundante das massas tumorais a qual está sobre a sua influência, e na qual o sistema imunológico (SI) se encontra comprometido. Como vantagem terapêutica os VO apresentam a capacidade de ultrapassar o silenciamento do sistema imunológico no microambiente tumoral através da ativação de linfócitos T contra antígenos tumorais capazes de criar memória imunológica. Entre as vantagens que destacam os VO em comparação com as terapêuticas existentes temos a sua capacidade de replicar seletivamente em células tumorais, atuando diretamente nas células alvo. Assim como, a particularidade da terapia viral oncolítica resultar da administração de um organismo vivo, o qual se replica ao longo do tempo, neste sentido a carga viral aumenta em função do tempo e obtemos uma carga superior à administrada. Através da edição genética é possível modificar a seletividade do vírus para as células alvo e aumentar a eficácia e a segurança da terapêutica (Chiocca e Rabkin, 2014).

## 2. VÍRUS ONCOLÍTICOS

A terapia viral oncolítica baseia-se na capacidade adquirida naturalmente por alguns vírus de infetar tecidos tumorais e levarem à sua eliminação. Esta vantagem recai sobre a capacidade de atuarem apenas nas células tumorais sem prejudicar as células normais (Marelli *et al.*, 2018). Os VO são internalizados pelas células cancerígenas devido à especificidade dos seus recetores de superfície. Mas nem todos os vírus possuem a capacidade de reconhecer as células tumorais. Na procura por mecanismos que permitam a interação entre o vírus e a célula, foi demarcada a particularidade que as células cancerígenas alcançaram, de escapar ao SI, evitando a sua deteção ou destruição, juntamente com a deficiência em algumas das vias de controle celular (Russell, Peng e Bell, 2012). Alguns exemplos são a resistência à apoptose, a supressão da tradução e a redução da principal resposta a uma infeção viral, como a via interferão (INF) do tipo I. Resultando assim na replicação viral em células permissivas, isto é que não têm a capacidade de deter e combater a infeção viral (Marelli *et al.*, 2018). Os VO tiraram assim partido de adaptações que os tecidos tumorais desenvolveram de modo a persistir no organismo quer escapando à regulação celular, quer pela evasão ao sistema imunológico, favorecendo assim a replicação viral.

Na Figura I estão representadas por percentagem as espécies de vírus mais frequentemente utilizadas em estudos oncolíticos.



**Figura I** – Representação gráfica dos dados estatísticos referentes à espécie viral utilizada nos ensaios clínicos tendo como objetivo o estudo do seu efeito nas células tumorais. Adaptado de (Lathwal et al., n.d.).

Muitas estratégias foram ponderadas de modo a aumentar a seletividade tumoral e reduzir a sua virulência nas células normais. Uma das estratégias base que fundamenta a segurança da TVO é que embora os recetores de superfície responsáveis pela entrada viral possam ser expressos em células normais o VO mesmo que consiga entrar na célula não sobrevive, pois necessita de uma falha na defesa do hospedeiro para permitir a sua replicação e a propagação do vírus (Jayawardena et al., 2020). Os vírus possuem intrinsecamente genes de evasão imunológica para permitir a infeção de células normais do hospedeiro. De modo a que esta terapêutica possa ser utilizada com maior segurança foram removidos ou modificados estes genes que potenciam a virulência do VO. Estas alterações melhoram a segurança dos VO ao permitir que o sistema imunológico detete e consiga eliminar a infeção nas células normais. Estas alterações promovem um mecanismo de segurança adicional à terapia viral

oncolítica, a desvantagem deste tipo de alteração é que podem afetar a capacidade replicativa do VO (Chiocca e Rabkin, 2014).

## **2.1. Mecanismo de infecção viral**

Os vírus oncolíticos apresentam dois mecanismos principais de ação que funcionam lado a lado com um objetivo final que se traduz na redução das massas tumorais. Estes provocam a lise ou apoptose das células tumorais como consequência direta da sua replicação e indiretamente levam à ativação do sistema imunológico (Alayo *et al.*, 2020).

### **2.1.1 Replicação viral**

O modo de atuação dos VO consiste numa primeira fase de infecção das células tumorais, onde ocorre a replicação viral e que posteriormente desencadeia a lise celular e liberta no microambiente tumoral todos os vírus formados. Este efeito citotóxico leva à disseminação dos VO para as células vizinhas permitindo a sua propagação. Assim é possível observar dentro do tumor a ampliação viral e a sua propagação célula a célula assim como a libertação para o ambiente extra tumoral permitindo alcançar zonas mais distantes metastizadas (Alayo *et al.*, 2020; Jayawardena *et al.*, 2020).

### **2.1.2. Sistema imunológico**

A segunda fase prende-se com a resposta do SI à infecção provocada pelos VO. Podemos subdividir em dois aspetos importantes que estão intimamente ligados, a imunidade antiviral e a imunidade antitumoral. O SI desencadeia uma resposta imune contra a infecção viral das células tumorais através do recrutamento de células imunológicas que atacam as células infetadas levando à sua destruição. A destruição dos tumores é assim conseguida por duas vias: pela lise provocada pelos VO como resultado da sua replicação e disseminação e pela lise desencadeada pelo SI em resposta à infecção viral (imunidade antiviral) (Marelli *et al.*, 2018). Estes dois mecanismos promovem a ativação de uma resposta antitumoral, pois torna-se visível para o organismo os componentes estruturais das células tumorais (Alayo *et al.*, 2020; Jayawardena *et al.*, 2020). A imunidade antitumoral duradoura é o objetivo final da terapia viral oncolítica, traduzindo-se na indução de uma resposta imune adaptativa contra antígenos tumorais (Alayo *et al.*, 2020).

A imunidade antitumoral é ativada como resposta do SI a uma reação inflamatória desencadeada pela infecção de células tumorais por VO. A infecção viral desencadeia a morte celular imunogénica (ICD) através de um mecanismo de apoptose celular. Este processo de destruição celular liberta padrões moleculares associados a perigo (DAMPs) que são reconhecidos por células apresentadoras de antígenos (APC), como macrófagos e células dendríticas no TME. Deste processo resulta uma resposta imune inata, despoletada pela atuação direta das células imunes e a libertação de citocinas recrutando outras moléculas imunológicas para o local. As células dendríticas são um fator importante na transição de uma resposta inata para uma resposta adaptativa específica contra os antígenos tumorais, através da estimulação de linfócitos T específicos (Jayawardena *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2020; Marelli *et al.*, 2018). Quando as células cancerígenas são destruídas estas libertam para TME antígenos associados a tumores (TAAs), que podem assim ser reconhecidos pelo SI quebrando o mecanismo de evasão imunológica característico do microambiente tumoral (Marelli *et al.*, 2018).

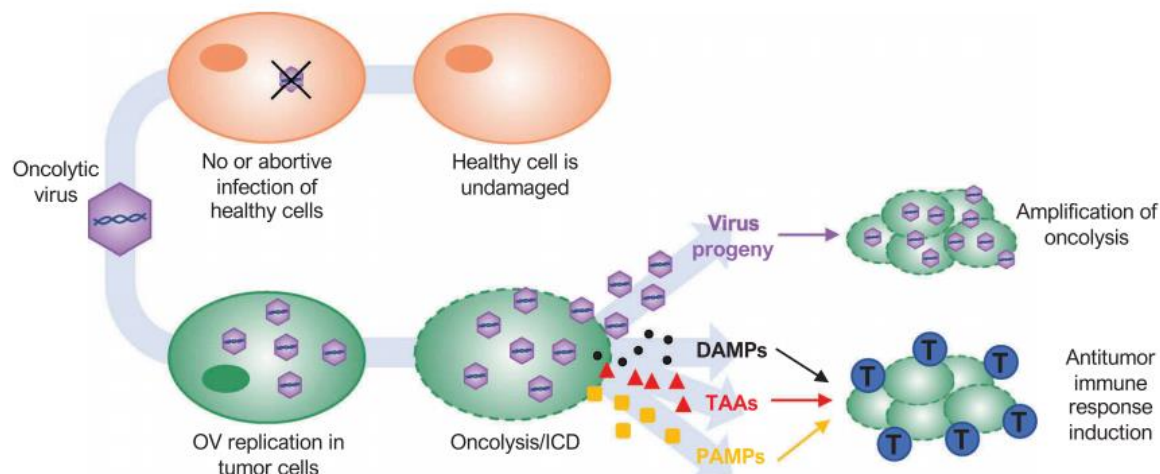
O passo chave para se atingir a imunidade antitumoral é a infiltração no microambiente tumoral de linfócitos T específicos contra antígenos tumorais e virais (Alayo *et al.*, 2020; Marelli *et al.*, 2018). A apresentação cruzada de antígenos tumorais despoletada pela libertação das estruturas celulares das células tumorais, leva ao aumento do reconhecimento pelos linfócitos T que são atraídos para o ambiente tumoral (Alayo *et al.*, 2020).

Inicialmente pensava-se que a resposta do SI contra a infecção viral (imunidade antiviral) representava uma desvantagem e seria benéfico tentar bloquear ou atrasar este processo, mas atualmente esta é vista como uma etapa muito importante no mecanismo de transição do microambiente tumoral de “frio” (não detetado pelo SI) para “quente”. Os VO criam um desafio ao SI promovendo no local da infecção uma resposta inflamatória com libertação de citocinas que atrai mais células imunológicas tornando a zona “visível” para o SI. Este é o primeiro passo do SI para criar memória imunológica contra antígenos tumorais e prevenir possíveis ressurgimentos do tumor (Marelli *et al.*, 2018).

O momento de viragem em que o TME é capaz de se modificar tem como agentes imunológicos as APC nomeadamente macrófagos e células dendríticas. Os macrófagos associados ao tumor (TAMs) podem evoluir como células pró-inflamatórias que promovem uma resposta inata T helper 1 (Th1) ou em células reparadoras anti-inflamatórias e que criam o ambiente imunossupressor. No ambiente tumoral estes são utilizados pelas células tumorais para escapar ao SI, mas a infecção por VO promove a transição dos macrófagos de anti-inflamatórios para pro-inflamatórios (Marelli *et al.*, 2018). Este ajuste na atividade dos

macrófagos leva à alteração do TME que intensifica a resposta do SI, e como tal é importante olhar para estes agentes como a ajuda na deteção do tumor e não como um mecanismo de eliminação dos VO (Marelli *et al.*, 2018).

Na Figura 2 é ilustrado um esquema do mecanismo de infecção dos vírus oncolíticos.



**Figura 2** - Representação esquemática do mecanismo de ação do VO bem como a resposta do sistema imunológico. A administração de VO no organismo leva a uma infecção seletiva das células tumorais com efeitos mínimos nas células normais. A consequente destruição das células tumorais é dividida em duas vias: lise direta das células infetadas e aumento indireto do reconhecimento pelo sistema imunológico. A infecção e replicação viral leva à lise celular e libertação dos descendentes do VO que se propagam a células tumorais distantes. A morte celular imunogénica desencadeia um processo inflamatório ao qual o organismo reage e promove a ativação do sistema imunológico. DAMPs - padrões moleculares associados a perigo; TAAs - antígenos associados ao tumor; PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos. Adaptado de (Davola e Mossman, 2019)

## 2.2. Barreiras à utilização

Tendo em conta que a resposta antiviral pode diminuir a eficácia do TVO pois potencia a eliminação dos VO antes de obter um mínimo eficaz de infiltração tumoral, é importante recorrer a estratégias que permitam manipular a resposta imune antiviral e mecanismos de administração favoráveis (Marelli *et al.*, 2018). Tendencialmente tem-se optado por administração intratumoral em vez de uma administração intravenosa dos VO, pelo facto de diminuir a probabilidade de uma resposta prematura do SI do hospedeiro contra os VO (Chiocca e Rabkin, 2014). Apesar da via intravenosa promover uma distribuição alargada que pode chegar a zonas metastizadas, esta tem a desvantagem de expor os VO à ação do SI (Chiocca e Rabkin, 2014; Marelli *et al.*, 2018).

Para obtermos a eficácia terapêutica pretendida com a TVO temos de atingir alguns dos pontos chave do seu mecanismo de ação. Temos de obter a seletividade, eficácia e a segurança que garantam a infeção e replicação nas células cancerígenas (Alayo *et al.*, 2020).

Apesar de os VO terem um enorme potencial ainda existem algumas barreiras na sua utilização. Estas barreiras estão maioritariamente associadas às características do ambiente tumoral, nomeadamente barreiras físicas, heterogeneidade das células tumorais, imunidade antiviral e o microambiente tumoral imunossupressor (Zheng *et al.*, 2019). Têm vindo a ser desenvolvidas estratégias que permitem superar estes obstáculos de modo a ser possível atingir um número eficaz de VO na zona tumoral que consiga minimizar a progressão do tumor.

### 3. TROPISMO NATURAL

Para se selecionar um vírus como VO este deve de apresentar estabilidade do material genético, juntamente com a precisão da polimerase e as dimensões do material genético favorável à edição genética (Jayawardena *et al.*, 2020). As características morfológicas também são muito importantes podendo o vírus ser envelopado ou nu. Preferencialmente procuram-se vírus envelopados pois é mais facilmente editada a sua estrutura externa. Mas na mesma perspetiva é mais facilmente detetado pelo SI do hospedeiro (Zheng *et al.*, 2019).

Algumas das características dos VO que reforçam a sua utilização como terapêutica do cancro são a capacidade de utilizar os recetores de superfície expressos pelas células tumorais para se ligarem às mesmas. A alteração das vias que regulam a apoptose e a proliferação celular observadas nas células cancerígenas e as quais levam a uma infeção viral bem-sucedida. Os mecanismos de evasão imunológica utilizados pelas células tumorais coincidem com as vias de propagação da infeção viral (Jhavar *et al.*, 2017; Lan *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2019). Estes mecanismos celulares adquiridos no processo de carcinogénese são o que permite ao VO distinguir e infetar seletivamente as células tumorais. Através da edição genética é possível explorar ainda mais as vantagens dos VO.

#### 3.1. Marcadores de superfície

Como determinado em cima é possível selecionar VO com tropismo natural para marcadores extracelulares expressos em células cancerígenas. O Poliovírus reconhece o marcador de superfície CD155, o qual é expresso na superfície das células tumorais para inibir



a resposta inata do hospedeiro (Jammal *et al.*, 2018). Para evitar a detecção e eliminação das células cancerígenas pela via do complemento, estas expressam também o marcador CD46 o qual, o vírus do Sarampo consegue utilizar como ponto de entrada na célula (Lok *et al.*, 2018). O Echovírus tem a capacidade de infectar células de ovário cancerígenas devido à expressão descontrolada de integrina  $\alpha 2\beta 1$  na superfície da célula favorecendo o reconhecimento e internalização do vírus (Shafren *et al.*, 2005). O Herpes simplex consegue infectar as células tumorais através dos recetores de superfície como o mediador da entrada do vírus Herpes (HVEM), nectina-1 e nectina-2 (Harrington *et al.*, 2015).

### **3.2. Vias intracelulares defeituosas**

Como escape à morte celular as células cancerígenas aumentam a expressão de moléculas anti-apoptóticas como a proteína transmembranar do linfoma da célula B extra grande (Bcl-xL) que é o alvo do vírus da doença de Newcastle (Mansour, Palese e Zamarin, 2011). A via de sinalização Ras é outro processo que regula a morte e a proliferação celular e que se encontra alterado em células tumorais. O Reovírus infecta especificamente as células onde este mecanismo se encontra alterado (Garant *et al.*, 2016). O vírus da Estomatite Vesicular é sensível ao INF, que é desencadeado como resposta a uma infeção viral, esta via encontra-se alterada nas células tumorais o que permite a sua infeção seletiva (Stojdl *et al.*, 2003).

## **4. ESTRATÉGIAS DE OTIMIZAÇÃO**

Através da engenharia genética os vírus oncolíticos podem ser modificados possibilitando o aumento da eficácia e da segurança da terapêutica. Em seguida apresentamos algumas das estratégias utilizadas para aumentar a seletividade dos vírus para as células tumorais e na otimização do efeito antitumoral.

### **4.1. Aumento da seletividade**

Apesar de alguns vírus terem adquirido tropismo natural para as células tumorais e se replicarem preferencialmente nestas células, inúmeras estratégias foram exploradas para aumentar a sua seletividade. Por norma os VO que ocorrem naturalmente com seletividade para as células tumorais dependem dos recetores celulares presentes nas células tumorais ou

de vias intracelulares alteradas que permitam a sua internalização. Seguindo esta tendência foram projetados VO geneticamente modificados para otimizar o tropismo tumoral que refletem as características observadas nos VO de ocorrência natural (Lan *et al.*, 2020).

#### **4.1.1. Marcadores de superfície**

Muitas vezes no desenvolvimento de um VO para melhorar a seletividade é necessário arranjar estratégias para que o vírus seja reconhecido pela célula alvo. Uma das soluções neste campo foi geneticamente inserir peptídios ou glicoproteínas na superfície do VO que sejam reconhecidas por recetores alvo na superfície das células tumorais. No caso do Adenovírus o seu capsídeo foi modificado para incorporar a porção arginina-glicina-ácido aspártico. Este permite a sua ligação às integrinas altamente expressas na superfície das células tumorais (Dmitriev *et al.*, 1998). Também se pode substituir os ligandos da superfície viral por glicoproteínas e outras estruturas que têm a característica de ser reconhecidas por recetores expressos por algumas células tumorais. Como exemplo um vetor Lentiviral pode ser modificado pela inserção da glicoproteína E2 no seu envelope permitindo assim que este se ligue a uma glicoproteína P presente na superfície dos melanócitos cancerígenos (Morizono *et al.*, 2005). Mais drasticamente é possível trocar o serotipo entre dois vírus da mesma espécie, obtendo um vírus com as propriedades mecânicas de um e o invólucro de outro. Foi possível utilizar a zona do genoma que determina as fibras do Adenovírus tipo 3 e inserir no Adenovírus tipo 5, passando este último a reconhecer os novos recetores alvo altamente expressos em células tumorais (Bommareddy, Shettigar e Kaufman, 2018). De modo a atingir recetores tumorais específicos pode ainda ser inserido no genoma viral um gene que codifica um fragmento de anticorpo que reconhece a estrutura alvo na superfície das células tumorais. No vírus Herpes simplex 1 (HSV – 1) foi inserido o gene que codifica uma cadeia de anticorpo com afinidade para o recetor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) expresso em vários tipos de tumores (Menotti *et al.*, 2008).

#### **4.1.2. Diminuição da virulência**

Com o decorrer do tempo foi possível obter maior conhecimento sobre os mecanismos carcinogénicos e também o ciclo viral. Foi possível assim tirar partido da supressão de respostas antivirais inerentes das células tumorais. Cumulativamente com a adaptação da replicação viral em células normais conhecida como virulência. Conjuntamente

estes dois mecanismos adaptativos condicionam a replicação dos VO apenas nas células tumorais quando geneticamente se reduz a virulência do VO. Uma das formas de diminuir a virulência dos VO é eliminando ou modificando genes virais envolvidos na inibição da apoptose, em células normais esta alteração leva à inibição da replicação viral, mas nas células tumorais não tem impacto devido à desregulação que estas vias sofrem no processo de carcinogênese. É possível assim através da engenharia genética projetar VO com tropismo para anormalidades intracelulares específicas das células tumorais. ONYX-015 é um Adenovírus com uma modificação no gene E1B que impede a degradação da proteína p53 (p53) e assim ocorre o processo de apoptose nas células normais condicionando a replicação viral apenas às células em que esta via se encontre suprimida (Ries e Korn, 2002). O HI01 é um VO com o mesmo mecanismo de seletividade para as células tumorais e já se encontra aprovado na China (Cheng *et al.*, 2015). A via de sinalização da proteína cinase ativada pela mitogênese (Ras-MAPK) nas células cancerígenas encontra-se altamente ativada a qual bloqueia a fosforilação da proteína cinase R (PKR) e permite a proliferação celular. O T-VEC foi projetado com deleções no gene ICP 34.5 e US11 que diminuem a PKR, estes genes atuam como um fator de neurovirulência, ao serem eliminados do genoma viral permitem a seletividade para células com esta via suprimida, neste caso pelos mecanismos tumorais, para promover a replicação celular sem o controle da PKR (Conry *et al.*, 2018). Outro exemplo da manipulação genética com o intuito de criar uma necessidade de dependência entre os VO e as células tumorais é o caso do TG6002, onde foi inativado o gene J2R que codifica a timidina-cinase viral (TK) esta proteína está envolvida na síntese de DNA, sem este gene funcional o VO depende do mecanismo de síntese intracelular que nas células tumorais está descontrolado. Para além da inibição da TK este VO foi desenvolvido com o intuito de depender cumulativamente da presença da ribonucleotídeo redutase celular (RR), esta enzima está integrada na cadeia de síntese de DNA ao limitar um passo do processo. Assim como os vírus, também as células cancerígenas dependem fortemente dos mecanismos de síntese de DNA, como tal é nessas células que o VO se consegue replicar seletivamente. O TG6002 é duplamente modificado pela eliminação dos genes J2R e I4L, que permite assim potenciar a seletividade do VO e diminuir os efeitos colaterais (Foloppe *et al.*, 2019).

#### **4.1.3. Promotores específicos de tecido ou tumor**

Outra forma de controlar a replicação viral é colocando a mesma sobre o controle de promotores específicos de tecido ou tumor. Esta técnica baseia-se na necessidade de um determinado elemento do ambiente tumoral ou do tecido celular sem o qual não é possível

ao VO se replicar ficando dependente do mesmo. Foi desenvolvido um Adenovírus, OBP-301 dependente da transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT), a qual controla a expressão viral dos genes E1. Esta proteína encontra-se expressa nas células tumorais para garantir o comprimento dos telómeros e manter a replicação das células tumorais (Sato *et al.*, 2013). Habitualmente as células tumorais apresentam defeitos na via do retinoblastoma (pRb) que aumenta o fator E2F livre e promove a divisão celular. Observando esta propriedade foi desenvolvido um Adenovírus, CG0070 em que a expressão de gene E1A é dependente do E2F, o mesmo encontra-se elevado nas células defeituosas onde a via pRb se apresenta desregulada (Ramesh *et al.*, 2006). O fator 1 alfa induzível por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) que é uma proteína induzida pelo ambiente de hipóxia gerado no TME é utilizada para condicionar a transcrição do gene E1A do Adenovírus, HYR-Ad (Post *et al.*, 2007). O promotor específico de tecido antigénio específico da próstata (PSA) é recorrentemente um dos exemplos utilizados para condicionar a replicação do VO em função da zona tumoral, como é o caso do Adenovírus RSOAds (Zhou *et al.*, 2017). Estes métodos permitem direcionar e condicionar a replicação viral para as zonas alvo onde se encontram os promotores com as características únicas do TME e celular.

#### **4.1.4. MicroRNA**

Uma das mais recentes técnicas para regular a seletividade dos VO é a utilização de microRNA (miRNA). Este é por norma utilizado pelo organismo na regulação negativa da expressão génica, resultando no silenciamento pós-transcricional dos genes alvo. Os VO foram geneticamente modificados para incorporar no seu material genético sequências alvo dos miRNA que se encontram presentes em células normais. Este direcionamento do VO é possível devido à desregulação do miRNA observada nas células cancerígenas. Quando o VO infecta uma célula que apresenta o miRNA alvo (célula normal) que complementa a sequência presente no seu genoma viral, resulta na degradação do seu material genético impedindo a replicação viral (Lan *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2018). Um exemplo específico onde se utiliza miRNA como fator regulador da replicação viral é o caso do Ad-miRT onde o miRNA-148a e o miRNA-216a controlam seletivamente a expressão do gene E1A bloqueando a replicação viral quando este emparelha com o genoma viral. Estes miRNA limitam a infeção às células cancerígenas preservando as células pancreáticas normais e prevenindo a infeção indesejada de hepatócitos recorrente na utilização de Adenovírus (Ros, Gironella e Fillat, 2014). Assim como o vírus Ad-199T que foi desenvolvido para transcrever as sequências alvo do miRNA-

199 presente nas células hepáticas saudáveis e que, com o emparelhamento impede a tradução do gene E1A que leva ao bloqueio da replicação viral (Callegari *et al.*, 2013).

## **4.2. Potenciar a entrega intracelular**

Para além do objetivo de atingir única e exclusivamente as células tumorais a TVO para ter a eficácia desejada deve de cumprir com alguns requisitos, como obter uma carga viral suficientemente eficaz no microambiente tumoral. Este passo é limitado pela baixa retenção/ penetração nos tecidos tumorais e a rápida deteção pelo sistema imunológico (Qiao *et al.*, 2020). Com o intuito de aumentar a presença de VO no tecido alvo, escapar à resposta antiviral e eliminar a necessidade de administrações repetidas, foram procuradas alternativas ao método de administração comum. Assim, para contornar a imunogenicidade e ultrapassar a dificuldade de administrações viscerais em locais de difícil acesso foram desenvolvidos mecanismos de entrega, tais como: células transportadoras, modificação do revestimento do VO pela conjugação de polímeros e a encapsulação em lipossomas (Jayawardena *et al.*, 2020).

### **4.2.1. Células transportadoras**

A utilização de células de mamíferos como células transportadoras, isto é que têm a capacidade de transportar VO, tem a vantagem de proteger o VO do sistema imunológico e de apresentar compatibilidade com o organismo, isto é, não serem detetados como organismos estranhos pelo SI. As células a utilizar têm de ter afinidade para o TME como é o caso das células de tecidos multipotentes como células-estaminais mesenquimais e neuronais, células presentes na corrente sanguínea como as células do SI, estas são atraídas para zonas onde se encontram estruturas vasculares anormais, hipóxia, inflamação, possivelmente por deteção de quimiocinas (Nakashima, Kaur e Chiocca, 2010). Estes transportadores devem manter o VO íntegro e replicativo possibilitando a amplificação da carga viral durante o transporte, evitar a sua neutralização pelo SI e direcionar a sua libertação no TME evitando a replicação em células fora do alvo (Bell e Roy, 2013). A utilização deste modelo de transporte ainda apresenta limitações ao nível da segurança pois a utilização de células com a capacidade de se diferenciar pode incorrer no risco de ser despoletada a sua divisão desregulada e poder resultar num processo cancerígeno (Nakashima, Kaur e Chiocca, 2010). Como exemplo o HAdV5/3 foi incorporado em células-estaminas mesenquimais que funcionam como vetor para a entrega do VO no microambiente tumoral (Hammer *et al.*, 2015).

## 4.2.2. Polímeros

A utilização de redes poliméricas como uma plataforma de entrega de VO tem sido a estratégia mais promissora na vertente de potenciar a entrega tumoral. Trata-se de uma modificação química simples e barata que se traduz na administração intratumoral de um hidrogel contendo o VO que permite prolongar a eficácia terapêutica através da sua libertação sustentada, proteger da reação do SI e limitar a necessidade de administrações repetidas (Qiao *et al.*, 2020). Os materiais utilizados têm de ser biocompatíveis, não imunogénicos e biodegradáveis. Como exemplo o acetato de polivinilo (PVA), em que a libertação é condicionada pelo pH (Qiao *et al.*, 2020); alginato, polissacárido que é degradado enzimaticamente (Choi *et al.*, 2013); gelatina, degradada enzimaticamente (Jung *et al.*, 2017). Estes mecanismos de entrega apresentam um perfil de segurança melhorado ao permitirem a entrega de VO sustentada no TME. A estrutura resultante funciona como um reservatório que diminui as perdas de carga viral na distribuição pelo organismo assim como diminuem a neutralização pelo sistema imunológico do VO não afetando a capacidade antitumoral do mesmo (Jung *et al.*, 2017).

## 4.2.3. Lipossomas

Outro tipo de plataforma de entrega são os lipossomas formados por uma bicamada de fosfolípidos. Estes fazem parte das nanopartículas mais utilizadas como mecanismo de entrega de fármacos. Um lipossoma pode encapsular e proteger os VO do SI e libertar no TME, com a capacidade replicativa intacta, aumentando assim a sua estabilidade na corrente sanguínea (Aoyama *et al.*, 2017). Como exemplo, temos o encapsulamento da estirpe MI, originando o M-LPO uma estrutura que integra o VO no lúmen delimitado pela bicamada fosfolipídica (Wang *et al.*, 2019). Uma limitação à utilização do complexo VO – lipossoma, é a sua dimensão, uma vez que, para se atingir o efeito de permeabilidade e retenção tumoral desejada são observadas restrições na dimensão do complexo. Para tentar colmatar esta barreira em vez de ser encapsulada a partícula viral, um grupo de investigadores desenvolveu o lipossoma Lip-pTS, no qual foi incorporado o material genético viral retirando o cápside viral. Esta estratégia levanta dúvidas ao eliminar a ferramenta base da infeção viral, o cápside, que permite o reconhecimento de moléculas na superfície celular o qual só é possível pela camada externa do VO. No entanto o complexo manteve a capacidade replicativa (Aoyama *et al.*, 2017). Em suma este mecanismo de entrega apresenta algumas limitações relevantes como

o tamanho do complexo e a limitação da remoção da camada externa do vírus, devendo ser mais aprofundada a sua viabilidade em estudos futuros.

### **4.3. Aumento da eficácia**

Na terapia viral oncolítica a eficácia terapêutica pode ser atingida através de dois mecanismos principais. Induzindo o sistema imunológico a reagir e promover a eliminação das células tumorais ou através dos diferentes processos consequentes da infecção e replicação do VO geneticamente modificado, que promove a morte celular independentemente da ação do SI.

#### **4.3.1. Potenciar a resposta do sistema imunológico**

O sistema imunológico é a maior arma de defesa do organismo e em certos casos é referido como sendo o mecanismo mais importante na resposta antitumoral, favorecendo a eliminação das células tumorais (Marelli *et al.*, 2018). Graças à engenharia genética é possível inserir no genoma viral genes que codificam proteínas capazes de estimular o SI. Em seguida exploramos algumas das estratégias adotadas na terapia viral oncolítica com o objetivo de intensificar a ação do SI.

##### **4.3.1.1. Citocinas e quimiocinas**

Na tentativa de promover a ativação do SI do hospedeiro foram introduzidos no genoma viral diferentes genes que codificam moléculas com propriedades imuno-estimuladoras. Como citocinas e quimiocinas que funcionam como moduladores da resposta inata e adaptativa do SI, estas são capazes de ativar e promover a diferenciação de linfócitos e influenciar a sua migração para o local alvo. O T-VEC é um Adenovírus com a inserção de duas cópias do gene do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) humano, o mesmo desencadeia a ativação de células apresentadoras de antígenos no local de infecção, promovendo a apresentação de antígenos tumorais ao SI para posteriormente desencadear a resposta imune (Conry *et al.*, 2018).

As citocinas pré-inflamatórias como a IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 são utilizadas como sinais de alerta para ativar a resposta inflamatória no local alvo. Alguns exemplos de vírus concebidos com a capacidade de sintetizar estas moléculas são: M032 (HSV) (Lasek, Zagożdżon e

Jakobisiak, 2014); Ad-RTS-hIL-12 (Lasek, Zagożdżon e Jakobisiak, 2014). Nos estudos realizados observou-se que a expressão e secreção desregulada de citocinas por VO pode provocar toxicidade e levar à síndrome de libertação de citocinas (Ge *et al.*, 2020). Para tentar evitar este efeito secundário e ao mesmo tempo utilizar as citocinas como ferramenta para modular o microambiente tumoral e permitir a transformação de um tumor “frio” num tumor “quente”, foi desenvolvido um VO que expressa na sua superfície ligada à membrana IL-2, vVDD-IL-12-FG (Ge *et al.*, 2020). Este vírus mantém a atividade replicativa e a capacidade de reprogramar células imunes sem provocar toxicidade sistémica.

A inserção de genes no genoma viral que codificam quimiocinas, permite a infiltração aprimorada de linfócitos T no microambiente tumoral. O vírus Vaccinia recombinante que expressa o ligante 5 de quimiocina CC (vCCL5) permitiu o aumento da infiltração tumoral de células T ativadas e um aumento da eficácia antitumoral (Li *et al.*, 2011). Numa perspetiva pós infeção do VO é benéfico o aumento de estímulos imunológicos para desencadear uma resposta antitumoral. Com este propósito foi desenvolvido um VO, VSV $\Delta$ 51-IFN $\gamma$ , que expressa no local de infeção o fator pró-inflamatório INF- $\gamma$ . Esta citocina promove a modulação da resposta imune com o aumento da expressão do complexo *major* de histocompatibilidade I (MHC I), que promove a apresentação de antígenos pela ativação de células dendríticas, otimizando a resposta imune antitumoral (Bourgeois-Daigneault *et al.*, 2016).

#### **4.3.1.2. Moléculas co-inibidoras e co-estimuladoras**

Para potenciar a resposta imune sem atuar diretamente na expressão das citocinas no organismo, foi direcionada a pesquisa por alternativas como as moléculas co-estimuladoras que promovem a ativação das células T e as co-inibitórias que limitam a resposta das células T, representando assim uma via de modulação da resposta imune. Esta via inter-relaciona as células inatas (células apresentadoras de antígenos, as células dendríticas e macrófagos) com as células adaptativas, os linfócitos (Sharpe e Freeman, 2002). Foi desenvolvido um VO, LOAd703 armado com ligando CD40 (CD40L) e o ligando 4-1BB (4-1BBL), estas são moléculas co-estimuladoras que ativam as células do SI desencadeando uma resposta imune Th1, favorecendo a infiltração de linfócitos T e células natural killer. Este VO foi desenvolvido para o estudo no caso de tumores pancreáticos, que são caracterizados pelo denso TME, o VO demonstrou a remodelação do microambiente tumoral através da interação com as vias internas das células e os seus efeitos no crescimento celular (Eriksson *et al.*, 2017). Outro



exemplo da edição genética com a inserção de genes que codificam moléculas co-estimuladoras é o caso do PROSTVAC, que foi modificado para expressar as moléculas co-estimuladoras designadas por TRICOM, (B7-1, ICAM-1 e LFA-3) (Singh *et al.*, 2015).

No microambiente tumoral um dos mecanismos alterados pelas células tumorais para escapar ao SI é a expressão de moléculas co-inibitórias (PDL-1, CTLA- 4) na superfície para inativar a resposta do SI. Com o intuito de bloquear esta adaptação das células tumorais foi programado um vírus Herpes Simplex, OVH-aMPD-1 capaz de expressar um fragmento de anticorpo que se liga ao PD-1 (aMPD-1scFv) (Lin *et al.*, 2020). Esta modificação permite uma ação localizada para potenciar o efeito antitumoral do VO, que atua diretamente no TME promovendo a infiltração de linfócitos T e a apresentação cruzada de antígenos tumorais pelas células apresentadoras de antígeno. Deste modo as células tumorais deixam de conseguir escapar ao SI, pois já não conseguem bloquear a resposta das células imunológicas através da sua inativação pela via PD-1 (Lin *et al.*, 2020).

### **4.3.2. Potenciar a morte celular**

Paralelamente à estimulação do sistema imunológico induzida pela infeção viral, também a morte celular é um passo importante no mecanismo de ação dos VO. Para melhorar a lise desencadeada pela replicação viral intracelular foram adaptados conceitos pré-existentes que promovem a morte celular e que ao serem introduzidos no genoma viral acresce a vantagem de direcionarem o efeito terapêutico única e exclusivamente às células infetadas pelo VO.

#### **4.3.2.1. Genes suicidas**

Para além de se tentar aumentar a ativação do SI com vista a desencadear uma reação imunológica mais eficaz contra as células tumorais, pode também ser potenciada a citotoxicidade mediada pela infeção viral. O que se pretende neste contexto é que a consequência da administração de VO seja a morte das células infetadas. Com este intuito foram desenvolvidos VO onde se inseriram genes suicidas, que levam à morte da própria célula infetada.

#### **4.3.2.1.1. Enzimas conversoras de pro-fármacos**

Uma das possibilidades de promover a morte das células cancerígenas é através da modificação genética de VO introduzindo genes de enzimas que convertem pro-fármacos não tóxicos em formas ativas que inibem a divisão celular no local de replicação viral (Lan *et al.*, 2020). Algumas das enzimas utilizadas para este efeito são a TK e a citosina-desaminase (CM). O seu mecanismo de ação envolve, no caso da TK a conversão do pró-fármaco ganciclovir em trifosfato de ganciclovir. O ganciclovir não é tóxico e só após a conversão enzimática na forma ativa é capaz de interferir na síntese de DNA, pois o produto final é um análogo dos nucleósidos e assim leva à paragem da cadeia replicativa (Lan *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2018). Do mesmo modo atua a CD, que converte o pró-fármaco 5-fluocitosina em 5-fluouracil (Lin *et al.*, 2018). A utilização destas enzimas favorece a atuação dos VO pois permite uma ação localizada e específica para as células tumorais, conseguindo potenciar a morte celular através da conversão de pró-fármacos na forma ativa, que leva à interrupção da divisão celular e aumenta a segurança, pois só no local de infeção viral é possível a conversão do fármaco. Como exemplo da utilização de genes suicidas com a enzima de conversão TK, temos o VO Ad-delors39TK-RGD, onde foi inserido no seu genoma um o gene da TK e que em combinação com a administração de ganciclovir demonstrou a morte efetiva de células cancerígenas (Kostova *et al.*, 2015). Outro exemplo deste mecanismo de ação é o VO, VACV  $\Delta$ J2R / FCUI que expressa o gene FCUI este gene codifica uma proteína de fusão bifuncional que integra a atividade da CD e da uracil fororibosil transferase o que resulta na conversão do pró-fármaco 5-fluorocitosina no composto 5-fluorouracil e posteriormente em 5-fluorouracil-monofosfato, que por fim bloqueia a síntese de DNA e de proteínas (Foloppe *et al.*, 2019).

#### **4.3.2.1.2. Genes supressores de tumor ou pro-apoptóticos**

Na categoria de genes suicidas, para além das enzimas conversoras de pro-fármacos temos os genes supressores de tumores ou pro-apoptóticos (Zheng *et al.*, 2019). Por norma os tumores provocam alterações nas vias de morte celular de modo a proliferarem no organismo. Para contornar esta barreira à morte das células tumorais foram desenvolvidos VO com a introdução de genes supressores de tumores e genes que codificam proteínas pro-apoptóticas com o intuito de aumentar a eficácia da TVO e promover a morte tumoral (Zheng *et al.*, 2019). Neste sentido foram desenvolvidos inúmeros VO com a inserção de genes supressores de tumores no genoma viral como o p53 e outros membros da mesma família (p63 e p73) (Bressy, Hastie e Grdzlishvili, 2017). Proteínas indutoras de apoptose (pro-

apoptóticas) foram estudadas no sentido de auxiliar no despoletar da morte celular como é o caso da apoptina. O VO Ad-VT tem um efeito inibitório nas células tumorais devido à replicação seletiva nestas células e à expressão da apoptina (Cui *et al.*, 2019). O VO NDV/Anh-TRAIL é outro exemplo, que neste caso expressa o ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL), que atua como uma citocina e leva à morte celular pela via mitocondrial (Wu *et al.*, 2017).

#### **4.3.2.2. Anti-angiogénese**

Com o intuito de potenciar a destruição das células tumorais os VO foram igualmente modificados para integrarem no seu genoma fatores anti-angiogénicos e assim conseguir bloquear a proliferação e metastização das células tumorais através da interação com a neoangiogénese (Zheng *et al.*, 2019). A formação de novos vasos sanguíneos é desencadeada, entre outros fatores, pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no sentido de inibir a neovascularização foram desenvolvidos anticorpos contra este fator e estes são administrados sistemicamente. Devido ao TME e à rápida eliminação, clearance do organismo não foi adotada como uma terapêutica ideal e continuamos em busca de alternativas. Nesta estratégia de tentar diminuir a formação de novos vasos sanguíneos foram desenvolvidos VO como o vírus Vaccínica que produz localmente o GLAF-I, um fragmento de anticorpo capaz de se ligar ao VEGF e inibir a proliferação das células endoteliais (Frentzen *et al.*, 2009). Endogenamente o VEGF é regulado pelo seu inibidor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGI), mas no microambiente tumoral este mecanismo está desregulado para favorecer a angiogénese, tentando alterar esta tendência, foi desenvolvido um Adenovírus, ZD55-VEGI-25I que liberta no local de infeção viral o VEGI que inibe a proliferação das células endoteliais, a angiogénese e o crescimento tumoral (Xiao *et al.*, 2010). Outros fatores endógenos que influenciam a neovascularização são a endostatina e a angiostatina estas são proteínas que derivam de fatores senescentes do mecanismo de coagulação. Para se atingir níveis eficazes e sustentados destas proteínas endógenas foram projetados VO capazes de expressar uma proteína de fusão endostatina/ angiostatina, originando o MV-E:A, o mesmo permite a diminuição do crescimento, viabilidade e migração das células endoteliais o que impede a angiogénese e assim bloqueia a proliferação das células tumorais (Hutzen *et al.*, 2014).

## 5. PRODUTOS APROVADOS

Atualmente já se encontram aprovados no mundo três fármacos constituídos por vírus oncolíticos. Estes foram classificados como medicamentos antineoplásicos e imunomoduladores. Iremos descrever brevemente as características de cada um dos VO utilizados.

### 5.1. Rigvir® (ECHO-7)

Este vírus foi o primeiro a ser aprovado mantendo a capacidade replicativa, não patogênico, do gênero Enterovirus, grupo ECHO, tipo 7 o qual não foi sujeito a nenhuma modificação no seu genoma viral. Está aprovado na Letônia desde 2004, atualmente é comercializado na Geórgia, Armênia e Uzbequistão. Foi aprovado com a indicação terapêutica para melanoma localizado, lesões subcutâneas e prevenção de metastização após cirurgia. Apesar de alguns casos reportados, não existe registo de ensaios clínicos quanto a este fármaco. No entanto foram reportados casos em que após-cirurgia de remoção das células tumorais, este VO foi administrado e demonstrou a capacidade de prevenir recidivas. A utilização generalizada do VO que se encontra no estado natural, apresenta alguns obstáculos como o potencial de adquirir patogenicidade, elevada probabilidade de ser neutralizado pelo SI e uma capacidade limitada de conseguir despoletar uma resposta antitumoral (RIGVIR GROUP, [s.d.a], [s.d.b]; Donina *et al.*, 2015).

### 5.2. Oncorine® (HI01)

O Adenovírus geneticamente modificado tipo 5, foi o primeiro vírus oncolítico aprovado pela State Food and Drug Administration na China em 2005. Os genes E1B e E3 foram removidos do genoma viral de modo a diminuir a virulência e aumentar a seletividade para as células tumorais. Deste modo apenas se consegue replicar em células cancerígenas onde a via de apoptose p53 se encontra defeituosa impedindo a replicação em células normais. Está aprovado como terapêutica de tumores de cabeça e pescoço em casos avançados e refratários, com recidivas nos nódulos linfáticos na zona cervical e metastizados; cancro do pulmão em estados avançados; casos avançados de tumores pleurais e com efusão peritoneal; cancro do pâncreas em casos não operáveis e recorrente após cirurgia (Liang, 2018; Shanghai Sunway Biotech Co., [s.d.]).

### 5.3. Imlygic® (T-VEC)

Talimogene laherparepvec é um vírus Herpes simplex de tipo I atenuado, resultante da deleção funcional de 2 genes ICP34.5 e ICP47, esta modificação representa uma diminuição da neurovirulência. No local do genoma onde se eliminou os genes é inserida uma sequência que codifica o GM-CSF. A deleção leva a uma redução da virulência do vírus que passa a só se conseguir replicar nas células tumorais onde a via PKR se apresenta alterada. A inserção do gene GM-CSF permite colmatar a diminuição da atividade viral, decorrente a diminuição da virulência, através do aumento da apresentação de antígenos tumorais às células T, pois este fator promove o recrutamento das células dendríticas ao local da infecção favorecendo a retenção de células apresentadoras de antígenos no TME. O VO foi aprovado pela *Food and Drug Administration* em 2015 e é atualmente comercializado nos Estados Unidos da América, Europa e Austrália. Estando aprovado com a indicação terapêutica para melanoma não ressecável com metástases locais ou à distância (Choi *et al.*, 2016; European Medicines Agency, 2019; Pol, Kroemer e Galluzzi, 2016).

## 6. ENSAIOS CLÍNICOS

Tendo em conta a relevância da estratégia viral como mecanismo de combate às células tumorais, estes potenciais agentes terapêuticos têm sido sujeitos a ensaios clínicos para que se possa demonstrar a sua aplicabilidade como terapêutica contra o cancro. Após uma pesquisa dos ensaios clínicos que estão neste momento em desenvolvimento, verifica-se que a grande maioria são estudos de terapêuticas combinadas, isto é, em que são administrados mais do que um tipo de fármaco. Regra geral os VO são combinados com fármacos antineoplásicos e imunomoduladores.

Na Tabela I são apresentados os VO que se encontram em ensaios clínicos, onde podemos observar os tipos de vírus, as modificações genéticas utilizadas e a condição clínica aplicável. A informação foi filtrada por ensaios clínicos em desenvolvimento onde apenas se analisa a eficácia VO e a sua segurança (informação retirada do site [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov), com pesquisa das palavras chave “oncolytic virus”).

## 7. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Ao longo de todo este percurso em busca do conhecimento e desenvolvimento de vírus com propriedades oncolíticas foram surgindo inúmeras hipóteses promissoras e melhor definidos os requisitos para se tornarem ferramentas terapêuticas na área oncológica. Estruturalmente o vírus tem de ser capaz de infectar e se replicar seletivamente nas células tumorais. Deve atuar junto do microambiente tumoral revertendo o efeito imunossupressor característico das células tumorais. Simultaneamente o sistema imunológico deve tornar-se apto a desencadear uma resposta antitumoral com a intervenção do VO. As modificações genéticas aqui apresentadas refletem os esforços direcionados à otimização da terapia viral oncolítica. Assegurando o efeito terapêutico, quer pela garantia da segurança de utilização, quer no aumento da eficácia. Apesar dos avanços na área, a terapia viral oncolítica ainda é vista como uma terapêutica secundária e numerosos ensaios clínicos têm optado por conjugar o vírus oncolítico com outra terapêutica complementar. Neste sentido futuramente devem ser projetados estudos mais abrangentes consolidando a interação do vírus com o organismo. Possibilitando a demonstração das vantagens da terapêutica e os pontos a serem melhorados.

Olhando para o campo científico é notório que cada vez mais, cresce o interesse na capacidade de modificar o material genético e com o aumento da informação genética disponível é cada vez mais pertinente capacitar a terapêutica com respostas específicas e dedicadas a populações alvo que apresentem as mesmas características genéticas. Tendo a terapia oncolítica como base, surge um grupo de investigadores que desenvolve e produz vírus que infectam e matam única e exclusivamente as células que se pretendem eliminar. Este processo é desencadeado pela análise e seleção de características únicas, num dado tumor de determinado doente. Seguidamente através de uma base de dados são construídos os VO que são feitos à medida para corresponder às características do tumor, que posteriormente é sintetizado em laboratórios robotizados. Esta estratégia está a ser testada em cães e após a validação da plataforma é pretendido prosseguir com ensaios clínicos em humanos (Humane Genomics, [s.d.]).] Esta é a esperança que fica de que a erradicação do cancro pode passar pela utilização de vírus oncolíticos deixando o futuro da oncologia no destino de um microrganismo.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAYO, Q. A., ITO, H., PASSARO, C., ZDIORUK, M., MAHMOUND, A. B., GRAUWET, K., ZHANG, X., LAWLER, S. E., REARON, D. A., GOINS, W. F., FERNANDEZ, S., CHIOCCA, E. A., NAKASHIMA, H. - **Glioblastoma infiltration of both tumor- and virus-antigen specific cytotoxic T cells correlates with experimental virotherapy responses.** Scientific Reports. (2020) 10:5095.
- AOYAMA, K., KURODA, S., MORIHIRO, T., KANAYA, N., KUBOTA, T., KAKIUCHI, Y., KIKUCHI, S., NISHIZAKI, M., KAGAWA, S., TAZAWA, H., FUJIWARA, T. - **Liposome-encapsulated plasmid DNA of telomerase-specific oncolytic adenovirus with stealth effect on the immune system.** Scientific Reports. (2017) 7: 14177.
- BELL, J. C., ROY, D. G. - **Cell carriers for oncolytic viruses: current challenges and future directions.** Oncolytic Virotherapy. 2 (2013) 47–56.
- BOMMAREDDY, P. K., SHETTIGAR, M., KAUFMAN, H. L. - **Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy.** Nature Reviews Immunology. 18 (2018) 498-513.
- BOURGEOIS-DAIGNEAULT, M. C., ROY, D. G., FALLS, T., TWUMASI-BOATENG, K., ST-GERMAIN, L. E., MARGUERIE, M., GARCIA, V., SELMAN, M., JENNINS, V. A., PETTIGREW, J., AMOS, S., DIOALLO, J., NELSON, B., BELL, J. C. - **Oncolytic vesicular stomatitis virus expressing interferon- $\gamma$  has enhanced therapeutic activity.** Molecular Therapy - Oncolytics. 3 (2016) 16001.
- BRESSY, C., HASTIE, E., GRDZELISHVILI, V. Z. - **Combining Oncolytic Virotherapy with p53 Tumor Suppressor Gene Therapy.** Molecular Therapy – Oncolytics. 5 (2017) 20–40.
- CALLEGARI, E., ELAMIN, B. K., D'ABUNDO, L., FALZONI, S., DONVITO, G., MOSHIRI, F., MILAZZO, M., ALTAVILLA, G., GIACOMELLI, L., FORNARI, F., HEMMINKI, A., VIRGILIO, F., GRAMANTIERI, L., NEGRINI, M., SABBIONI, S. - **Anti-Tumor Activity of a miR-199-dependent Oncolytic Adenovirus.** PLOS ONE. 8:9 (2013) 1–16.
- CHENG, P., WECHMAN, S. L., MCMASTERS, K. M., ZHOU, H. S. - **Oncolytic replication of E1b-deleted adenoviruses.** Viruses. 7:11 (2015) 5767–5779.
- CHIOCCA, E. A., RABKIN, S. D. - **Oncolytic viruses and their application to cancer immunotherapy.** Cancer Immunology Research. 2:4 (2014) 295–300.

CHOI, A. H., O'LEARY, M. P., FONG, Y., CHEN, N. G. - **From benchtop to bedside: A review of oncolytic virotherapy.** *Biomedicines.* 4:18 (2016) 1–20.

CHOI, J. W., KANG, E., KWON, O-J., YUN, T.J., PARK, H-K., KIM, P-H., KIM, SW., KIM, JH., YUN, C-O. - **Local sustained delivery of oncolytic adenovirus with injectable alginate gel for cancer virotherapy.** *Gene Therapy.* 20 (2013) 880–892.

CONRY, R. M., WESTBROOK, B., MCKEE, S., NORWOOD, T. G. - **Talimogene laherparepvec: First in class oncolytic virotherapy.** *Human Vaccines and Immunotherapeutics.* 14:4 (2018) 839–846.

CUI, C-X., LI, Y-Q., SUN, Y-J., ZHU, Y-L., FANG, J-B., BAI, B., M., LI, W-J., LI, S-Z., MA, Y-Z., LI, X., WANG, W-H., JIN, N-Y. - **Antitumor effect of a dual cancer-specific oncolytic adenovirus on prostate cancer PC-3 cells.** *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.* 37 (2019) 352.e1-352.e18.

DAVOLA, M. E., MOSSMAN, K. L. - **Oncolytic viruses: how “lytic” must they be for therapeutic efficacy?.** *Oncolmmunology.* 8:6 (2019) e1581528.

DMITRIEV, I., KRASNYKH, V., MILLER, C. R., WANG, M., KASHENTSEVA, E., MIKHEEVA, G., BELOUSOVA, N., CUIEL, D. T. - **An Adenovirus Vector with Genetically Modified Fibers Demonstrates Expanded Tropism via Utilization of a Coxsackievirus and Adenovirus Receptor-Independent Cell Entry Mechanism.** *Journal of Virology.* 72:12 (1998) 9706–9713.

DONINA, S., STRELE, I., PROBOKA, G., AUZINS, J., ALBERTS, P., JONSSON, B., VENSKUS, D., MUCENIECED, A. - **Adapted ECHO-7 virus Rigvir immunotherapy (oncolytic virotherapy) prolongs survival in melanoma patients after surgical excision of the tumour in a retrospective study.** *Melanoma Research.* 25:5 (2015) 421–426.

ERIKSSON, E., MILENOVA, I., WENTHE, J., STAHL, M., LEJA-JARBLAND, J., ULLENHAG, G., DIMBERG, A., MORENO, R., ALEMANY, R., LOSKOG, A. - **Shaping the tumor stroma and sparking immune activation by CD40 and 4-1BB signaling induced by an armed oncolytic virus.** *Clinical Cancer Research.* 23:19 (2017) 5846–5857.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Imlygic.** (2019). [Acedido a 26 jun. 2020]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/imlygic>

FOLOPPE, J., KEMPF, J., FUTIN, N., KINTZ, J., CORDIER, P., PICHON, C., FINDELI, A., VORBURGER, F., QUEMENEUR, E., ERBS, P. - **The Enhanced Tumor Specificity of TG6002, an Armed Oncolytic Vaccinia Virus Deleted in Two Genes Involved in**



**Nucleotide Metabolism.** *Molecular Therapy - Oncolytics.* 14 (2019) 1–14.

FRENTZEN, A., YU, Y. A., CHEN, N., ZHANG, Q., WEIBEL, S., RAAB, V., SZALAY, A. A. - **Anti-VEGF single-chain antibody GLAF-I encoded by oncolytic vaccinia virus significantly enhances antitumor therapy.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 106:31 (2009) 12915–12920.

GARANT, K. A., SHMULEVITZ, M., PAN, L., DAIGLE, R.M., AHN, D-G., GUJAR, S.A., LEE, P. W. K. - **Oncolytic reovirus induces intracellular redistribution of Ras to promote apoptosis and progeny virus release.** *Oncogene.* 35:6 (2016) 771–782.

GE, Y., WANG, H., REN, J., LIU, W., CHEN, L., CHEN, H., YE, J., DAI, E., MA, C., JU, S., GUO, Z. S., LIU, Z., BARTLETT, D. L. - **Oncolytic vaccinia virus delivering tethered IL-12 enhances antitumor effects with improved safety.** *Journal for ImmunoTherapy of Cancer.* 8:1 (2020) 1–8.

HAMMER, K., KAZCOROWSKI, A., LIU, L., BEHR, M., SCHEMMER, P., HERR, I., NETTELBECK, D. M. - **Engineered adenoviruses combine enhanced oncolysis with improved virus production by mesenchymal stromal carrier cells.** *International Journal of Cancer.* 137:4 (2015) 978–990.

HARRINGTON, K. J., PUZANOV, I., HECHT, J. R., HODI, F. S., SZABO, Z., MURUGAPPAN, S., KAUFMAN, H. L. - **Clinical development of talimogene laherparepvec (T-VEC): A modified herpes simplex virus type-1-derived oncolytic immunotherapy.** *Expert Review of Anticancer Therapy.* 15:12 (2015) 1389–1403.

HUMANE GENOMICS - **Cancer is still a big problem.** [Acedido a 12 jun. 2020]. Disponível em: <https://www.humanegenomics.com/>

HUTZEN, B., Bid, H. K., Houghton, P. J., PIERSON, C. R., POWELL, K., BRAYASZ, A., RAFFEL, C., STUDEBAKER, A. W. - **Treatment of medulloblastoma with oncolytic measles viruses expressing the angiogenesis inhibitors endostatin and angiostatin.** *BMC Cancer.* 14:1 (2014) 1–13.

JAMMAL, M. P., MICHELIN, M. A., NOMEINI, R. S., MURTA, E. F. C - **Recombinant poliovirus for cancer immunotherapy.** *Annals of Translational Medicine.* 6:18 (2018) 368–368.

JAYAWARDENA, N., POIRIER, J. T., BURGA, L. N., BOSTINA, M. - **Virus–Receptor Interactions and Virus Neutralization: Insights for Oncolytic Virus Development.** *Oncolytic Virotherapy.* 9 (2020) 1–15.

- JHAWAR, S. R., THANDONI, A., BOMMAREDDY, P. K., HASSAN, S., KOHLHAPP, F. J., GOYAL, S., SCHENKEL, J., SILK, A., ZLOZA, A. - **Oncolytic viruses-natural and genetically engineered cancer immunotherapies**. *Frontiers in Oncology*. 7:202 (2017) 1–11.
- JUNG, B. K., OH, E., HONG, J. W., LEE, Y., PARK, K. D., YUN, C. O. - **A hydrogel matrix prolongs persistence and promotes specific localization of an oncolytic adenovirus in a tumor by restricting nonspecific shedding and an antiviral immune response**. *Biomaterials*. 147 (2017) 26–38.
- KELLY, E., RUSSELL, S. J. - **History of oncolytic viruses: Genesis to genetic engineering**. *Molecular Therapy*. 15:4 (2007) 651–659.
- KOSTOVA, Y., MANTWILL, K., HOLM, P. S., ANTON, M. - **An armed, YB-1-dependent oncolytic adenovirus as a candidate for a combinatorial anti-glioma approach of virotherapy, suicide gene therapy and chemotherapeutic treatment**. *Cancer Gene Therapy*. 22:1 (2015) 30–43.
- LAN, Q., XIA, S., WANG, Q., XU, W., HUANG, H., JIANG, S., LU, L. - **Development of oncolytic virotherapy: from genetic modification to combination therapy**. *Frontiers of Medicine*. 14:2 (2020) 160–184.
- LATHWAL, A., KUMAR, R., RAGHAVA, P. - **Statistics Of OvirusTdb**. [Acedido a 220 jun. 2020]. Disponível em: <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/ovirustdb/stat.php>
- LASEK, W., ZAGOŹDŹON, R., JAKOBISIAK, M. - **Interleukin 12: Still a promising candidate for tumor immunotherapy?** *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 63:5 (2014) 419435.
- LI, J., O'MALLEY, M., URBAN, J., SAMPATH, P., GUO, Z. S., KALINSKI, P., THORNE, S. H., Bartlett, D. L. - **Chemokine expression from oncolytic vaccinia virus enhances vaccine therapies of cancer**. *Molecular Therapy*. 19:4 (2011) 650–657.
- LIANG, M. - **Oncorine, the World First Oncolytic Virus Medicine and its Update in China**. *Current Cancer Drug Targets*. 18:2 (2018) 171–176.
- LIN, C., REN, W., LUO, Y., LI, S., CHANG, Y., LI, L., XIONG, D., HUANG, X., XU, Z., YU, Z., WANG, Y., ZHANG, J., HUANG, C., Xia, N. - **Intratumoral Delivery of a PD-1-Blocking scFv Encoded in Oncolytic HSV-1 Promotes Antitumor Immunity and Synergizes with TIGIT Blockade**. *Cancer immunology research*. 8:5 (2020) 632–647.
- LIN, C. Z., XIANG, G. L., ZHU, X. H., XIU, L. L., SUN, J. X., ZHANG, X. Y. - **Advances in**

**the mechanisms of action of cancer-targeting oncolytic viruses (review).** *Oncology Letters*. 15:4 (2018) 4053–4060.

LOK, A., DESCAMPS, G., TESSOULIN, B., CHIRON, D., EVEILLARD, M., GODON, C., BRIS, Y. L., VABRET, A., BLLANGER, C., MAILLET, L., BARILLÉ-NION, S., GREGOIRE, M., FONTENEAU, J-F., GOUILL, S. L., MOREAU, P., TANGY, F., AMIOT, M., MOREAU-AUBRY, A., PELLAT-DECEUNYNCK, C. - **P53 regulates CD46 expression and measles virus infection in myeloma cells.** *Blood Advances*. 2:23 (2018) 3492–3505.

MANSOUR, M., PALESE, P., ZAMARIN, D. - **Oncolytic Specificity of Newcastle Disease Virus Is Mediated by Selectivity for Apoptosis-Resistant Cells.** *Journal of Virology*. 85:12 (2011) 6015–6023.

MARELLI, G., HOWELLS, A., LEMOINE, N. R., WANG, Y. - **Oncolytic viral therapy and the immune system: A double-edged sword against cancer.** *Frontiers in Immunology* 9 (2018) 1–8.

MENOTTI, L., CERRETANI, A., HENGEL, H., CAMPADELLI-FIUME, G - **Construction of a Fully Retargeted Herpes Simplex Virus 1 Recombinant Capable of Entering Cells Solely via Human Epidermal Growth Factor Receptor 2.** *Journal of Virology*. 82:20 (2008) 10153–10161.

MORIZONO, K., XIE, Y., RINGPIS, G. E., JOHNSON, M., NASSANIAN, H., Lee, B., WU, L., Chen, I. S. Y. - **Lentiviral vector retargeting to P-glycoprotein on metastatic melanoma through intravenous injection.** *Nature Medicine*. 11:3 (2005) 346–352.

NAKASHIMA, H. KAUR, B., CHIOCCA, E. A. - **Directing systemic oncolytic viral delivery to tumors via carrier cells.** *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 21:2–3 (2010) 119–126.

POL, J., KROEMER, G., GALLUZZI, L. - **First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy.** *Oncolmmunology*. 5:1 (2016) e111564.

POST, D. E., SANDBERG, E. M., KYLE, M. M., DEVI, N. S., BRAT, D. J., XU, Z., TIGHIOUART, M., VAN MEIR, E. G. - **Targeted cancer gene therapy using a hypoxia inducible factor-dependent oncolytic adenovirus armed with interleukin-4.** *Cancer Research*. 67:14 (2007) 6872–6881.

QIAO, H., CHEN, X., WANG, Q., ZHANG, J., HUANG, D., CHEN, E., QIAN, H., ZHONG, Y., TANG, Q., CHEN, W. - **Tumor localization of oncolytic adenovirus assisted by pH-degradable microgels with JQ1-mediated boosting replication and PD-L1**

**suppression for enhanced cancer therapy.** *Biomaterials Science.* 8:9 (2020) 2472–2480.

RAMESH, N., GE, Y., ENNIST, D. L., ZHU, M., MINA, M., GANESH, S., REDDY, P. S., YU, D.-C. - **CG0070, a conditionally replicating granulocyte macrophage colony-stimulating factor - Armed oncolytic adenovirus for the treatment of bladder cancer.** *Clinical Cancer Research.* 12:1 (2006) 305–313.

RIES, S., KORN, W. M. - **ONYX-015: Mechanisms of action and clinical potential of a replication-selective adenovirus.** *British Journal of Cancer.* 86:1 (2002) 5–11.

RIGVIR GROUP – **Rigvir.** [s.d.a]. [Acedido a 26 jun. 2020]. Disponível em: <https://www.rigvir.com/products/rigvir.php>

RIGVIR GROUP - **SPC English.** [s.d.b]. [Acedido a 26 jun. 2020]. Disponível em: <https://www.rigvir.com/spc-eng.php>

ROS, X. B. D., GIRONELLA, M., FILLAT, C. - **MiR-148a- And miR-216a-regulated Oncolytic Adenoviruses Targeting Pancreatic Tumors Attenuate Tissue Damage Without Perturbation of miRNA Activity.** *Molecular Therapy.* 22:9 (2014) 1665–1677.

RUSSELL, S. J., PENG, K. W., BELL, J. C. - **Oncolytic virotherapy.** *Nature Biotechnology.* 30:7 (2012) 658–670.

SATO, D., KURIHARA, Y., KONDO, S., SHIROTA, T., URATA, Y., FUJIWARA, T., SHINTANI, S. - **Antitumor effects of telomerase-specific replication-selective oncolytic viruses for adenoid cystic carcinoma cell lines.** *Oncology Reports.* 30:6 (2013) 2659–2664.

SHAFREN, D. R., SYLVESTER, D., JOHANSSON, E. S., CAMPBELL, I. G., BARRY, R. D. - **Oncolysis of human ovarian cancers by echovirus type 1.** *International Journal of Cancer.* 115:2 (2005) 320–328.

SHANGHAI SUNWAY BIOTECH CO., Ltd - 上海 三维 生物 技术 有限公司/  
**ONCORINE- Recombinant Human Adenovirus Type 5 Injection.** [Acedido a 26 jun. 2020]. Disponível em: <http://www.sunwaybio.com.cn/en/product.html>

SHARPE, A. H., FREEMAN, G. J. - **The B7-CD28 superfamily.** *Nature Reviews Immunology.* 2:2 (2002) 116–126.

SINGH, P., PAL, S. K., ALEX, A., AGARWAL, N. - **Development of PROSTVAC immunotherapy in prostate cancer.** *Future Oncology.* 11:15 (2015) 2137–2148.

STOJDL, D. F., LICHTY, B. D., TENOEVER, B. R., PATERSON, J. M., POWER, A. T.,

KNWOLES, S., MARIUS, R., REYNARD, J., POLIQUIN, L., ATKINS, H., BROWN, E. G., DURBIN, R. K., DURBIN, J. E., HISCOTT, J., BELL, J. C. - **VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents.** *Cancer Cell.* 4:4 (2003) 263–275.

WANG, Y., HUANG, H., ZOU, H., TIAN, X., HU, J., QIU, P., HU, H., YAN, G. - **Liposome Encapsulation of Oncolytic Virus M1 to Reduce Immunogenicity and Immune Clearance in Vivo.** *Molecular Pharmaceutics.* 16:2 (2019) 779–785.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – **Câncer.** (2018). [Acedido a 30 jun. 2020]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

WU, Y., HE, J., GENG, J., AN, Y., YE, X., YAN, S., YU, Q., YIN, J., ZHANG, Z., Li, D. - **Recombinant Newcastle disease virus expressing human TRAIL as a potential candidate for hepatoma therapy.** *European Journal of Pharmacology.* 802 (2017) 85–92.

XIAO, T., FAN, J. K., HUANG, H. L., GU, J. F., LI, L. Y., LIU, X. Y. - **VEGI-armed oncolytic adenovirus inhibits tumor neovascularization and directly induces mitochondria-mediated cancer cell apoptosis.** *Cell Research.* 20:3 (2010) 367–378.

ZHENG, M., HUANG, J., TONG, A., YANG, H. - **Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Barriers and Recent Advances.** *Molecular Therapy - Oncolytics.* 15:37 (2019) 234–247.

ZHOU, J., HAO, L., SHI, Z., NING, S., HE, H., ZHAO, Y., DONG, Y., LI, Z., HE, J., ZANG, G., HAN, C. - **Stability analysis on the radioactive iodine-labelled prostate cancer-specific recombinant oncolytic adenovirus.** *Oncology Letters.* 14:6 (2017) 6403–6408.

# ANEXO

*Tabela 1 – Exemplo de ensaios clínicos utilizando VO.*

<b>Vírus</b>	<b>Vírus oncolítico</b>	<b>Modificação genética</b>	<b>Aplicação clínica</b>	<b>Data de início do estudo</b>	<b>Número NCT</b>
<b>AdV</b>	ORCA - 010	Eliminação E1A Mutação T1 no gene E3/19k Inserção RGD	• Adenocarcinoma da próstata	Jan/19	04097002
	NG-641	Inserção FAP-Tac Inserção CXCL9 e CXCL10 Inserção INF- $\alpha$	• Carcinoma metastizado • Tumor epitelial	Jan/20	04053283
	NG-350A	Inserção AC Anti-CD40	• Carcinoma metastizado • Tumor epitelial	Fev/19	03852511
	TILT-123	Inserção TNF- $\alpha$ e IL-2	• Melanoma metastizado	Fev/20	04217473
<b>HSV</b>	C134	Eliminação ICP34.5 e PKR Inserção IRS-1	• Glioblastoma multiforme • Astrocitoma anaplásico • Gliosarcoma	Set/19	03657576
	M032	Eliminação ICP34.5 Inserção IL-12	• Glioblastoma multiforme recorrente • Gliosarcoma • Astrocitoma anaplásico	Set/14	02062827
	RPI	Eliminação ICP34.5 e 47 Inserção de proteína fusogénica	• Carcinoma de células escamosas cutâneo	Mai/20	04349436
<b>VACV</b>	TG6002	Eliminação TK e RR Inserção FCU	• Glioblastoma	Oct/17	03294486