

Joana Maria da Silva Fiteiro

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “A Imunoterapia Combinada Como o Futuro da Imunoterapia Para o Cancro” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, do Dr. Rui Aguiar Pinto, da Dra. Nádia Antunes 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 Farmacéuticas.

Setembro de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Joana Maria da Silva Fiteiro

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “A Imunoterapia Combinada Como o Futuro da Imunoterapia Para o Cancro”, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, do Dr. Rui Aguiar Pinto, da Dra. Nádía Antunes 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 2017

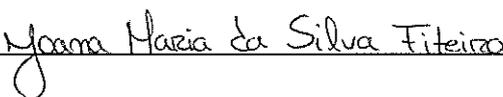


UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Joana Maria da Silva Fiteiro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2012146630, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “A Imunoterapia Combinada Como o Futuro da Imunoterapia Para o Cancro” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular 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, 13 de Setembro de 2017

A handwritten signature in black ink, reading "Joana Maria da Silva Fiteiro", is written over a horizontal line. The signature is cursive and includes a large initial 'J'.

(Joana Maria da Silva Fiteiro)

Agradecimentos

É com emoção e muita alegria que termino a última etapa do meu percurso académico e, neste momento tão particular, quero expressar os meus profundos agradecimentos a todos os que me acompanharam ao longo desta jornada e de um modo especial:

A Deus, por me permitir este momento e tudo o que o envolve, assim como por todas as graças que ao longo da minha vida me tem concedido.

Aos meus pais, por todo o amor e apoio incondicionais, motivação, conselhos, ensinamentos e valores.

A toda a minha família, sempre presente no meu coração, pelo carinho, confiança e apoio determinantes, pela presença em todos os momentos e por acreditarem sempre em mim.

Ao Prof. Dr. Sérgio Simões, pela orientação da monografia, pelo seu saber e por toda a atenção e disponibilidade sempre prestadas.

Ao Dr. Rui Aguiar Pinto e à Dra. Sónia Alfar, pelos conhecimentos e conselhos transmitidos, pela amabilidade e por toda a confiança em mim depositada.

À Dra. Nádia Antunes e a todos os profissionais da Farmácia Antunes, pelo acolhimento, pelos ensinamentos e experiências partilhados, pelo exemplo, pela disponibilidade constante e pelos laços criados.

A todos os professores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pelos conhecimentos transmitidos, dedicação e valores inculcados no decurso dos cinco anos.

À Diana Domingues, por todos os conselhos e ajuda ao longo destes cinco anos, e à minha Águeda, pelo apoio e força constantes, pelas conversas e por toda a amizade.

Aos melhores amigos que Coimbra me podia ter dado, em especial à Carol e à Rita, à Ana Isabel, à Ana Rita, à Cátia, ao Duarte e à Lúcia, por todos os momentos vividos, pelo apoio, pela paciência para os meus disparates, pelos risos partilhados, pelas aventuras, por todo o afeto e pela forte amizade que nos une e que ficará para sempre.

A todos, o meu mais profundo e sincero, Obrigada!

Índice

PARTE I - A Imunoterapia Combinada Como o Futuro da Imunoterapia Para o Cancro

Abreviaturas	7
Resumo	9
Abstract	10
1. Imunoterapia para o Cancro	11
2. Inibidores do <i>Checkpoint</i> Imunitário (CI)	12
2.1. Inibidores do CTLA-4	13
2.2. Inibidores do PD-I e do PD-LI	14
3. Resistência à Imunoterapia para o Cancro	16
3.1. Resistências Inata e Adaptativa	16
3.1.1. Fatores de Resistência Intrínsecos ao Tumor	17
3.1.2. Fatores de Resistência Extrínsecos ao Tumor	19
3.2. Resistência Adquirida	21
4. Imunoterapia Combinada	22
4.1. Racional das Diferentes Combinações com Inibidores do CI	22
4.1.1. Aumentar a Libertação de Antígenos Tumoraes	23
4.1.2. Estimular a Apresentação de Antígenos Tumoraes	24
4.1.3. Promover a Ativação de Linfócitos T	25
4.1.4. Estimular a Migração de Linfócitos T e Inibir a Migração de MDSC e Treg	26
4.1.5. Promover a Infiltração Tumoral de Linfócitos T	26
4.1.6. Aumentar o Reconhecimento das Células Tumoraes pelos Linfócitos T	27
4.1.7. Promover a Morte das Células Tumoraes Mediada pelos Linfócitos T	28
4.2. Combinações Aprovadas com Inibidores do CI	29
4.2.1. Combinação Ipilimumab + Nivolumab	29
4.2.2. Combinação Pembrolizumab + Pemetrexed e Carboplatina	30
4.3. Os Inibidores do CI Mais Utilizados na Imunoterapia Combinada	30
4.4. A Determinação de Biomarcadores e a Terapêutica Personalizada	31

4.4.1. PD-L1, Linfócitos T de Infiltração Tumoral (TIL) e Carga Mutacional	32
4.4.2. Imunograma do Cancro.....	33
4.5. Estabelecimento de Parcerias em Imunoterapia Combinada.....	34
5. Perspetivas Futuras e Conclusão	35
Referências Bibliográficas	37
Anexos (Tabela I e Tabela 3)	45
 <u>PARTE II – Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica</u>	
Abreviaturas.....	56
Introdução	57
Análise SWOT Fundamentada	58
1. Análise Interna - Pontos Fortes	59
2. Análise Interna - Pontos Fracos	64
3. Análise Externa – Oportunidades.....	64
4. Análise Externa – Ameaças	68
Conclusão	68
Referências Bibliográficas	69
 <u>PARTE III – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária</u>	
Abreviaturas.....	71
Introdução	72
Análise SWOT Fundamentada	72
1. Análise Interna - Pontos Fortes	73
2. Análise Interna – Pontos Fracos	78
3. Análise Externa – Oportunidades.....	79
4. Análise Externa – Ameaças	82
Conclusão	83
Referências Bibliográficas	84
Anexos	85

Joana Maria da Silva Fiteiro

Parte I

A Imunoterapia Combinada Como o Futuro da Imunoterapia Para o Cancro

Monografia realizada no âmbito da Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação do Professor Doutor Sérgio Simões,
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Abreviaturas

ACT – *Adoptive Cell Therapy* / Terapia Celular Adaptativa

AMP – Adenosina Monofosfato

APC – *Antigen Presenting Cells* / Células Apresentadoras de Antígenos

β2M - β-2-microglobulina

BcL-X_L – *B-cell Lymphoma-Extra Large*

BSM - Bristol-Myers Squibb

CAR - *Chimeric Antigen Receptor*

CCL – *Chemokine (C-C motif) Ligand*

CI – *Checkpoint Imunitário*

CTLA-4 – *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*

CXCL - *Chemokine (C-X-C motif) Ligand*

DAMPs - Padrões Moleculares Associados ao Dano

DC – Células Dendríticas

EC – Ensaio Clínico

EMA – *European Medicines Agency*

FDA – *U. S. Food and Drug Administration*

GM-CSF – *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* / Fator Estimulador de Colônias Granulócito-Macrófago

HNSCC – Carcinoma das Células Escamosas da Cabeça e Pescoço

IDO – Indolamina-2,3-dioxigenase

IFN - Interferão

IL – Interleucina

IPRES - *Innate Anti-PD-1 Resistance Signature*

JAK1 e 2 – *Janus Kinase 1 e 2*

LAG-3 - *Lymphocyte-activation Protein 3*

Linfócitos NK – Linfócitos *Natural Killer*

Linfócitos Treg – Linfócitos T reguladores

mAc – Anticorpos Monoclonais

MDSC - *Myeloid-Derived Suppressor Cells/* Células Supressoras Derivadas da Linhagem Mieloide

MHC - Complexo *Major* de Histocompatibilidade

NSCLC - Carcinoma Pulmonar de Não Pequenas Células

PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Agentes Patogénicos

PD-1 – *Programmed Death 1*

PD-L1 – *Programmed Death Ligand 1*

PD-L2 – *Programmed Death Ligand 2*

PI3K – *Phosphatidylinositol 3-Kinase*

PTEN – *Phosphatase and Tensin Homolog*

RCC - Carcinoma das Células Renais

TAM – *Tumor-Associated Macrophages /* Macrófagos Associados ao Tumor

TCR – Recetor dos Linfócitos T

TGF- β - *Transforming Growth Factor*

TIL – Linfócitos T de Infiltração Tumoral

SHP2 – *Src Homology Phosphatase 2*

SI – Sistema Imunitário

STAT1 – *Signal Transducer and Activator of Transcription 1*

VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*

Resumo

Após a aprovação do primeiro inibidor do *checkpoint* imunitário, a imunoterapia para o cancro tem sido alvo de uma forte ascensão, com o desenvolvimento de diversas estratégias que intervêm na resposta imune anti-tumoral, sendo, hoje, considerada como um dos pilares da terapêutica para o cancro. O sucesso da imunoterapia tem tido como principais responsáveis os inibidores do *checkpoint* imunitário e distingue-se pela indução de respostas com uma grande durabilidade, para diversos tipos de tumores. Contudo, estes benefícios clínicos não se observam em todos os doentes, fruto da existência de vários mecanismos de resistência inata e adaptativa, que impedem uma resposta inicial à imunoterapia, ou de resistência adquirida, desenvolvida após uma resposta inicial e que conduz à recidiva do doente. Com o intuito de vencer as resistências do tumor ou do seu microambiente à imunoterapia, a imunoterapia combinada preconiza a combinação sinérgica de uma imunoterapia, geralmente um inibidor do *checkpoint* imunitário, com outra imunoterapia ou com outro tipo de terapêutica (quimioterapia, radioterapia, entre outras), para atuar em diferentes etapas do ciclo cancro-sistema imunitário e, assim, melhorar a sobrevivência de um maior número de doentes.

Nesta monografia, irei expor os principais fatores que podem contribuir para a resistência à imunoterapia, qual o raciocínio subjacente às combinações de inibidores do *checkpoint* imunitário com outras estratégias terapêuticas, quais as combinações já aprovadas e abordarei, ainda, a necessidade da determinação de biomarcadores para a seleção da melhor imunoterapia ou combinação para cada caso, assim como o estabelecimento de parcerias entre empresas resultante do investimento empregue na área da imunoterapia combinada, que se apresenta como o futuro da imunoterapia para o cancro.

Palavras-chave

Imunoterapia para o Cancro; Inibidores do *Checkpoint* Imunitário; CTLA-4; PD-1; PD-L1; Resistência à Imunoterapia; Imunoterapia Combinada; Ensaios Clínicos; Biomarcadores

Abstract

Since the approval of the first immune checkpoint inhibitor, the cancer immunotherapy has grown strongly with the development of different strategies that act in the cycle cancer-immunity, and, today is considered, as one of the pillars of cancer care. The immune checkpoint inhibitors are the mainly responsible for the success of cancer immunotherapy, which can induce durable responses for a large range of tumour types. Despite of this clinical benefits, not all the patients can achieve them due to mechanisms of innate and adaptive resistance that prevent an initial response to the immunotherapy, or due to mechanisms of acquired resistance that lead to relapse of patients after a period of response. In order to overcome the tumour or the tumour microenvironment resistances, combined immunotherapy advocates the synergic combination between an immunotherapy, generally an immune checkpoint inhibitor, with another immunotherapy or with another cancer therapy (such as chemotherapy, radiotherapy, etc.), to act at different points of the cancer-immunity cycle and, therefore, to improve the survival of a major number of patients.

In this monograph, I will expose the main factors that contribute to the resistance to immunotherapy, what is the rational underlying the immune checkpoint inhibitor combinations with other therapeutic strategies, what are the combined immunotherapies that are already approved, and I will also refer the crescent need of determine several biomarkers with the aim of selecting the best immunotherapy or combination for each individual case, as well as the establishment of partnerships between companies as a result of the investment made in the combined immunotherapy area, which is currently seen as the future of the cancer immunotherapy.

Keywords

Cancer Immunotherapy; Immune Checkpoint Inhibitor; CTLA-4; PD-1; PD-L1; Resistance to Immunotherapy; Combined Immunotherapy; Clinical trials; Biomarkers

I. Imunoterapia para o Cancro

A imunoterapia consiste num tipo de terapêutica para o cancro que visa restaurar ou potenciar a resposta do sistema imunitário (SI) contra as células tumorais (1). Esta é uma abordagem nascida nos anos 90 do século XIX, no entanto, é a partir do século XXI que ocorre a rápida ascensão da imunoterapia, com a aprovação do primeiro inibidor do *checkpoint* imunitário (CI), o ipilimumab (2).

As principais estratégias de imunoterapia que se encontram a ser estudadas e/ou comercializadas incluem citocinas, vacinas terapêuticas (de peptídeos, de células tumorais, de células dendríticas ou genéticas), terapias celulares adaptativas (ACT) com linfócitos T de infiltração tumoral (TILs) ou com linfócitos T modificados com recetores (TCRs) ou com CARs (*Chimeric Antigen Receptor*) específicos para o tumor, inibidores do CI, agonistas de sinais co-estimulatórios, inibidores do metabolismo imunossupressor, vírus oncolíticos, entre outras (1,3). Em função do seu mecanismo de ação, a imunoterapia pode ser classificada em dois tipos distintos: passiva e ativa. A imunoterapia passiva é dotada de atividade anti-tumoral intrínseca, como são os casos dos anticorpos monoclonais (mAc) contra o tumor, da ACT e dos vírus oncolíticos. Ao invés, as restantes estratégias correspondem a imunoterapias ativas, que têm como intuito estimular o sistema imunitário, de uma forma específica ou inespecífica, de modo a que este atue mais intensa e eficazmente na erradicação do tumor (3). A [tabela 1](#), em anexo, sumariza as imunoterapias para o cancro e as combinações aprovadas pela FDA e pela EMA desde a ascensão da imunoterapia.

Cada estratégia de imunoterapia intervém numa ou mais etapas do ciclo cancro-sistema imunitário, com vista à obtenção de uma resposta imune anti-tumoral eficaz. Este ciclo ([figura 1](#)) é constituído por sete etapas e inicia-se com a libertação de antígenos tumorais para o microambiente tumoral que, de seguida, são internalizados e processados por células apresentadoras de antígenos (APC), onde se incluem as células dendríticas (DC). As APC migram para os órgãos linfoides secundários, onde subsequentemente apresentam os referidos antígenos a linfócitos T *naive*, que iniciam a sua ativação num processo complexo em que intervêm múltiplos sinais co-estimulatórios e inibitórios. Uma vez ativados, os linfócitos T efetores migram para a corrente sanguínea e, daí, para o microambiente tumoral, onde contactam com os antígenos tumorais para os quais são específicos. A referida interação culmina na morte das células tumorais, o que resulta, novamente, na libertação de antígenos tumorais, reiniciando-se o ciclo cancro-sistema imunitário (4,5).

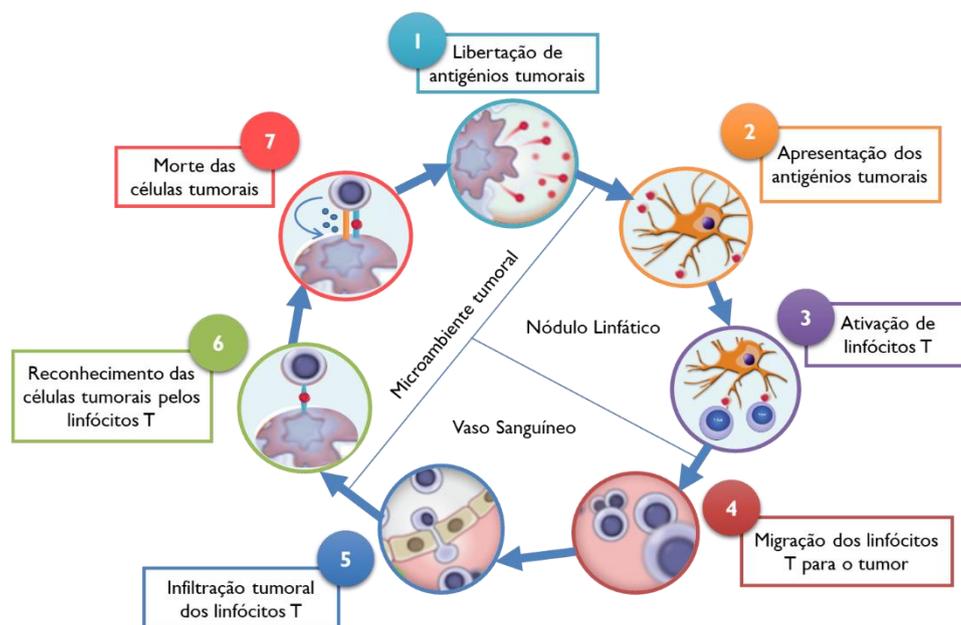


Figura 1 – A resposta imune anti-tumoral processa-se através do ciclo cancro-sistema imunitário, acima apresentado, constituído por sete etapas, desde a libertação de antígenos tumorais até à morte das células tumorais mediada pelos linfócitos T. Adaptado de (4)

A imunoterapia é, hoje, vista como um dos tipos mais promissores para a terapêutica do cancro, podendo vir a ser, brevemente, um dos quatro pilares para o seu tratamento, assim como são a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia (6).

2. Inibidores do *Checkpoint* Imunitário (CI)

Os inibidores dos *checkpoints* imunitários (CI) CTLA-4, PD-1 e PD-L1 vieram revolucionar o paradigma vigente na terapêutica para o cancro e são, atualmente, reconhecidos como um componente-chave para o tratamento de diversos tipos de cancro. O sucesso deste tipo de imunoterapia é tal, que se espera que em 2023 o mercado da imunoterapia atinja vendas superiores a 13 biliões de dólares, sendo estas dominadas pelos inibidores do CI (7).

Os CI são moléculas do sistema imunitário responsáveis por vias de sinalização inibitórias, fundamentais não só para a manutenção da tolerância a auto-antígenos, impedindo a reatividade contra as células normais do próprio organismo (resposta autoimune), mas também para modelar a duração e a extensão das respostas imunes, de modo a minimizar a ocorrência de efeitos excessivamente destrutivos para o tecido periférico. Porém, como mecanismo de evasão à resposta imune, os tumores tiram proveito dos CI, que induzem tolerância periférica aos antígenos tumorais e limitam a atividade efetora dos linfócitos T contra as células tumorais. Neste sentido, os CI podem ser bloqueados por intermédio de mAbs, designados de inibidores dos CI, permitindo a ativação dos linfócitos T e a recuperação da sua atividade anti-tumoral (figura 2) (8,9).

Atualmente encontram-se aprovados inibidores do CTLA-4, do PD-1 e do PD-L1 ([tabela 1](#), em anexo) e estão em desenvolvimento inibidores de outros CI, tais como do TIMG-3, LAG-3, B7-H3, B7-H4, VISTA, CEACAMI, BTLA e do TGIT (10).

2.1. Inibidores do CTLA-4

O CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) é um recetor inibitório que é expresso à superfície dos linfócitos T *naive* quando estes são sujeitos a ativação (9). Este CI controla a amplitude da ativação dos linfócitos T (8) e está envolvido na indução da tolerância periférica ao evitar a ativação de linfócitos T auto-reativos, sendo considerado o líder dos CI por atuar numa das fases iniciais da resposta imune (11).

A ativação de linfócitos T *naive* compreende a sua proliferação e diferenciação e é um processo que decorre nos órgãos linfoides secundários, requerendo a ocorrência de três sinais sucessivos, em que o primeiro deles é a apresentação de antígenos por moléculas MHC das APC aos TCR dos linfócitos T *naive*. Porém, os linfócitos T não prosseguem a sua ativação, entrando em anergia e em apoptose, sem um segundo sinal que corresponde à interação co-estimulatória entre o ligando B7 (CD80 ou CD86) das APC e o seu recetor CD28 dos linfócitos T. Por conseguinte, é despoletada uma via de sinalização que promove o aumento da sobrevivência dos linfócitos T, a sua expansão clonal, assim como a produção de citocinas (terceiro sinal), tais como a IL-2, responsáveis pela diferenciação dos linfócitos T (11).

O CTLA-4 apenas atua como co-recetor inibitório quando os linfócitos T estão em ativação, uma vez que nos linfócitos T *naive* se encontra em vesículas intracelulares e é a interação co-estimulatória entre o ligando B7 das APC e o recetor CD28 dos linfócitos T a despoletar a translocação do CTLA-4 para a superfície da membrana citoplasmática (11). Uma vez à superfície, o CTLA-4 compete com o CD28 pela ligação ao B7, tendo uma afinidade dez vezes superior para este ligando do que o CD28. Por sua vez, a ligação do CTLA-4 ao B7 não só previne a ocorrência do sinal co-estimulatório necessário para a ativação dos linfócitos T, como também desencadeia um sinal inibitório ([figura 2A](#)) (9), podendo, ainda, ter efeitos inibitórios extrínsecos ao linfócito T, tais como a remoção do ligando B7 da superfície das APC (8). Ademais, os linfócitos T reguladores (Treg) expressam constitutivamente este CI, pelo que o CTLA-4 atua, ainda, nestas células, potenciando a sua ação imunossupressora (11).

Deste modo, a terapêutica anti-CTLA-4 visa impedir a disponibilidade do CTLA-4 para a ligação ao B7 das APC, permitindo que este se ligue, na sua totalidade, ao CD28 ([figura 2A](#)). Como resultado, o reportório de linfócitos T ativados aumenta e a imunossupressão mediada pelos linfócitos Treg diminui, o que potencia as respostas imunes desencadeadas, quer seja a

anti-tumoral ou outra, consoante o antígeno em causa. Por este motivo, e atendendo à relevância do CTLA-4 na indução da tolerância periférica, a inibição do CTLA-4 pode aumentar o risco de desenvolvimento de efeitos adversos imuno-mediados, que se assemelham a doenças autoimunes (11). Até ao momento, está aprovado um inibidor do CTLA-4, o ipilimumab (Yervoy[®]), após ter demonstrado um aumento da sobrevivência global dos doentes com melanoma (12), tendo sido este o primeiro inibidor do CI a receber aprovação pela FDA e pela EMA (tabela I, em anexo).

2.2. Inibidores do PD-I e do PD-LI

O PD-I (*Programmed Death 1*) atua como recetor inibitório expresso à superfície dos linfócitos T efetores (após ativação dos linfócitos T), podendo encontrar-se ainda em linfócitos B e NK (8). Este CI tem como ligandos o PD-LI (*Programmed Death Ligand 1*) e o PD-L2 (*Programmed Death Ligand 2*), ambos expressos nas APC, sendo que o PD-LI, o seu principal ligando, encontra-se ainda distribuído em diversos tipos de células saudáveis e em algumas células tumorais. Por outro lado, a expressão do PD-LI nestas células pode ser induzida pela presença de citocinas inflamatórias, como o IFN- γ , fenómeno que ocorre numa situação de resposta imune ativa (9).

A ligação do PD-I dos linfócitos T efetores aos seus ligandos despoleta uma cascata de sinalização iniciada pela tirosina fosfatase SHP2, que inibe diversas proteínas cinase envolvidas na proliferação e sobrevivência dos linfócitos T, entre as quais a PI3K (4). Como resultado, a produção de citocinas, a transcrição do fator anti-apoptótico Bcl-X_L e a proliferação diminuem (13), assim como diminui a atividade citotóxica dos linfócitos T, devido à inibição da secreção de mediadores citotóxicos (4), como a granzima e a perforina, cruciais para a morte celular induzida por estes linfócitos. Apesar da via PD-I/PD-LI atuar sobretudo na limitação da atividade de linfócitos T efetores, pode, ainda, reduzir a atividade dos linfócitos NK e a produção de anticorpos pelos linfócitos B, dada a presença de PD-I nestas células (8).

Ao invés do CTLA-4, que intervém na fase de ativação de linfócitos T *naive* nos nódulos linfáticos, a via PD-I/PD-LI atua numa fase mais tardia da resposta imune, ao limitar a atividade dos linfócitos T efetores nos tecidos periféricos durante um processo inflamatório, pelo que evita um dano tecidual excessivo (9) e permite a manutenção da tolerância periférica (11).

Não obstante, a via PD-I/PD-LI pode representar um mecanismo de evasão do tumor ao sistema imunitário (SI), na medida em que o PD-I é expresso pelos linfócitos T de infiltração tumoral (TIL) e o seu ligando PD-LI pode ser expresso, constitutiva e/ou indutivamente, em diversas células tumorais e em células do SI no microambiente tumoral, culminando na inibição

da resposta imune contra o tumor. A terapêutica anti-PD-I ou anti-PD-LI visa, assim, reverter o efeito inibitório destes CI e subsequentemente restaurar a função dos TIL (figura 2B). É de notar que a inibição do PD-I ou do PD-LI resulta numa menor frequência de efeitos adversos imuno-mediados do que o anti-CTLA-4, uma vez que a via PD-I/PD-LI atua nos linfócitos T efetores envolvidos nas respostas imunes em curso, interferindo num espectro mais reduzido de linfócitos T relativamente ao CTLA-4 (11). Até à data foram já aprovados, pela FDA e pela EMA, dois inibidores do PD-I, o nivolumab (Opdivo®) e o pembrolizumab (Keytruda®), e três anti-PD-LI, o atezolizumab (Tecentriq®), o durvalumab (Imfinzi®) e o avelumab (Bavencio®) (tabela I, em anexo), estando muitos outros em ensaios clínicos e para vários tipos de cancros.

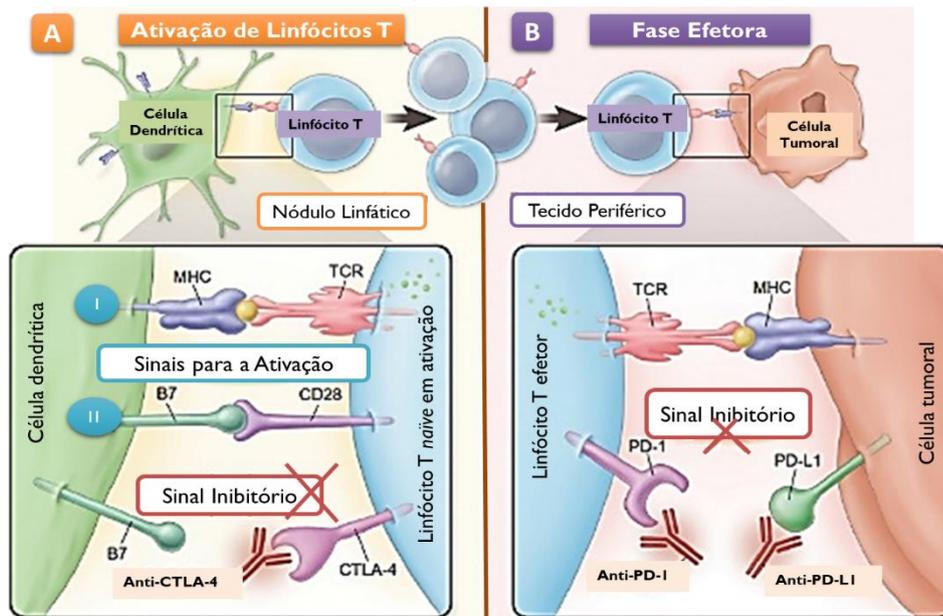


Figura 2 – Imunoterapia para o cancro através da inibição dos checkpoints imunitários CTLA-4 e PD-I ou PD-LI

Figura 2A – O CTLA-4 atua nos nódulos linfáticos e é expresso nos linfócitos T em ativação neste local, onde compete com o CD28 pela ligação ao B7 das células dendríticas. A ligação do CTLA-4 ao B7 evita que este se ligue ao CD28 e, assim, impede a ocorrência do sinal co-estimulatório (2º sinal) crucial para a ativação dos linfócitos T, para além de despoletar um sinal inibitório. Deste modo, o anti-CTLA-4 favorece a ligação do B7 ao CD28 dos linfócitos T e, por conseguinte, aumenta o repertório de linfócitos T ativados, onde se incluem os linfócitos T específicos para o tumor. Adaptado de (14)

Figura 2B – O PD-I é expresso nos linfócitos T efetores e tem como principal ligando o PD-LI, que se encontra sobretudo nos locais inflamados e nas células tumorais (locais ricos em IFN- γ). A ligação do PD-I ao PD-LI das células tumorais induz um sinal inibitório que evita a atividade citotóxica e inflamatória dos linfócitos T, pelo que os anti-PD-I/PD-LI permitem que os linfócitos T exerçam a sua ação contra o tumor. Adaptado de (14)

3. Resistência à Imunoterapia para o Cancro

A imunoterapia para o cancro, em particular a terapêutica com inibidores do CI, tem revelado benefícios sem precedentes, sobretudo no que respeita à grande durabilidade de resposta. Não obstante, um dos grandes obstáculos da imunoterapia prende-se com o facto de uma elevada percentagem de doentes não responder a este tipo de terapêutica, fruto da presença de resistências, tal como se denota na taxa de resposta aos inibidores do PD-1/PD-L1, que raramente excede os 40% na maioria dos tipos de cancro (15).

A resistência à imunoterapia pode ser classificada em três tipos: inata, adaptativa e adquirida. A resistência inata caracteriza-se pela incapacidade de resposta do tumor à imunoterapia, não ocorrendo uma resposta imune anti-tumoral ativa, ao passo que a resistência adaptativa ocorre quando as células tumorais são reconhecidas pelo sistema imunitário, iniciando-se uma resposta imune ativa, porém rapidamente se adaptam à resposta imune e, por isso, não respondem à imunoterapia logo no seu início. Por seu turno, designa-se de resistência adquirida quando o tumor responde inicialmente à imunoterapia e, após um determinado período de tempo de tratamento, adquire resistência, resultando na recidiva do doente e na progressão da doença (16).

3.1. Resistências Inata e Adaptativa

A resistência adaptativa pode manifestar-se clinicamente do mesmo modo que a resistência inata, uma vez que ambas impedem que o doente seja sensível à imunoterapia para o cancro. Na origem destes tipos de resistências podem estar diversos fatores intrínsecos às células tumorais e fatores do microambiente tumoral (extrínsecos ao tumor) (16), tal como se encontra indicado na tabela 2.

Tabela 2. Fatores intrínsecos e fatores extrínsecos ao tumor (do microambiente tumoral) que contribuem para a resistência inata e adaptativa à imunoterapia (Adaptado de [16])

Fatores Intrínsecos ao Tumor	Fatores Extrínsecos ao Tumor
Mecanismo de Resistência	Mecanismo de Resistência
Reduzida Expressão de Antígenos Tumorais	Células do Sistema Imune Imunossupressoras
Reduzida Apresentação de Antígenos Tumorais	Moléculas com Ação Imunossupressora
Exclusão Tumoral de Linfócitos T	Exaustão de Linfócitos T
Expressão de PD-L1	
Insensibilidade aos Linfócitos T	
<i>IPRES (Innate Anti-PD-1 Resistance Signature)</i>	

3.1.1. Fatores de Resistência Intrínsecos ao Tumor

Um dos principais mecanismos de resistência à imunoterapia diz respeito à reduzida expressão de antígenos pelo tumor, em particular de neoantígenos (15). As células tumorais podem sobreexpressar antígenos que, por serem também expressos em células saudáveis, são considerados auto-antígenos, os designados antígenos associados ao tumor, para os quais os TIL são escassos e, existindo, apresentam uma reduzida avidéz, devido à tolerância central e periférica para evitar a autoimunidade (17). Porém, os tumores podem, ainda, expressar neoantígenos, que resultam de mutações não-silenciosas nas células tumorais, pelo que não pertencem ao fenótipo humano normal e, por isso, quando libertados, são os principais responsáveis pela imunogenicidade do tumor, ao permitirem a ativação de linfócitos T que escapam à tolerância e reconhecem unicamente as células tumorais. Deste modo, um tumor que apresente uma reduzida expressão de neoantígenos, o que se correlaciona com uma baixa carga mutacional, será mais resistente à imunoterapia (15,17).

Por outro lado, os tumores podem evitar a apresentação do seus antígenos tumorais aos linfócitos T citotóxicos, através de alterações que afetem a expressão de moléculas MHC da classe I à superfície das células tumorais (16). Para tal contribuem a sub-expressão ou mutações nos genes que codificam a cadeia pesada da MHC I, a cadeia leve β -2-microglobulina (β 2M) ou os componentes da maquinaria de processamento de antígenos, sendo de notar que em cerca de um terço dos tumores humanos, foram identificadas alterações genéticas na cadeia pesada da MHC I e na β 2M (18).

Ademais, as células tumorais apresentam modificações em diversas vias de sinalização oncogénicas que podem conduzir a uma menor infiltração tumoral de linfócitos T citotóxicos (exclusão tumoral de linfócitos T) ou à limitação da sua atividade. Um caso que é relativamente comum em diversos tipos de cancro consiste na perda de expressão do supressor tumoral PTEN (por deleção ou mutação do gene *PTEN*), o que potencia a via de sinalização da PI3K e, por sua vez, estimula a proliferação das células tumorais, promove a produção de citocinas imunossupressoras que reduzem a infiltração de linfócitos T, e inibe a autofagia, o que permite resistir à apoptose mediada pelos linfócitos T citotóxicos (15). Outro exemplo diz respeito à ativação constitutiva da via de sinalização Wnt/ β -catenina, pois é um evento que, ao reduzir a expressão da quimiocina CCL4, leva à menor migração das DC para o microambiente tumoral, o que resultará numa menor ativação de linfócitos T específicos para o tumor e, em última instância, reduz a presença de linfócitos T no microambiente tumoral (19).

A expressão constitutiva do ligando PD-L1 pelo tumor é um fator que contribui para a resistência inata (figura 3) à imunoterapia e pode advir de mutações em alguns genes tumorais, que ativam vias de sinalização oncogénicas, onde se incluem a deleção do gene *PTEN* ou a amplificação do amplificação PDJ, que codifica o PD-L1, o PD-L2 e a JAK2. Ao invés, a expressão indutiva de PD-L1 é considerada um mecanismo de resistência adaptativa (figura 3), uma vez que é consequência da produção de IFN- γ pelos TIL após reconhecerem as células tumorais durante uma resposta imune anti-tumoral ativa. Visto que a ligação PD-1/PD-L1 resulta, entre outros efeitos, na inibição da atividade citotóxica dos TIL, a expressão de PD-L1 promove a resistência aos vários tipos de imunoterapia, com exceção da terapêutica anti-PD-1/PD-L1, cuja eficácia depende da existência desta ligação no microambiente tumoral (20).

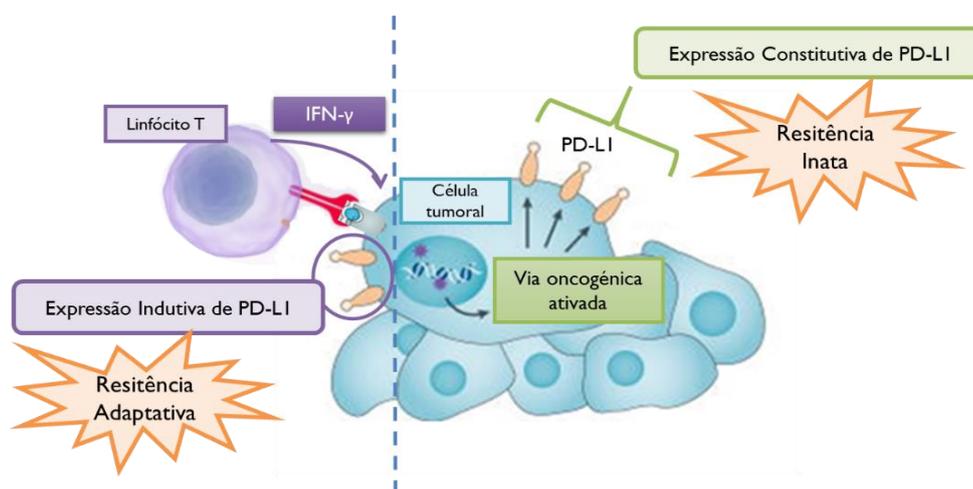


Figura 3 – Como resultado de diversas mutações, as células tumorais podem ativar vias oncogénicas que resultam na expressão constitutiva de PD-L1, considerada como um mecanismo de resistência inata. Por outro lado, após o reconhecimento das células tumorais pelos linfócitos T efetores é produzido IFN- γ que induz a expressão de PD-L1 nas células tumorais que, por sua vez, se liga ao PD-1 dos linfócitos T e inibe a atividade efetora destes linfócitos, sendo um mecanismo de resistência adaptativa. As expressões constitutiva e indutiva de PD-L1 não se excluem mutuamente, pois o PD-L1 expresso de forma inata aumenta na presença de IFN- γ . Adaptado de (60)

O tumor pode, ainda, apresentar mutações que impactem na via de sinalização do IFN- γ , nomeadamente que afetem a JAK1, a JAK2, o STAT1 ou os recetores 1 e 2 do IFN- γ e, em função do momento em que surgem as mutações, as alterações na via do IFN- γ podem corresponder a um fator de resistência inata, adaptativa ou adquirida. O IFN- γ é produzido pelos TIL após reconhecerem o seu antígeno e o seu papel consiste em recrutar células do sistema imunitário (SI) para o microambiente tumoral, para além de promover a expressão tumoral de moléculas MHC I, potenciando a apresentação de antígenos tumorais aos TIL, e

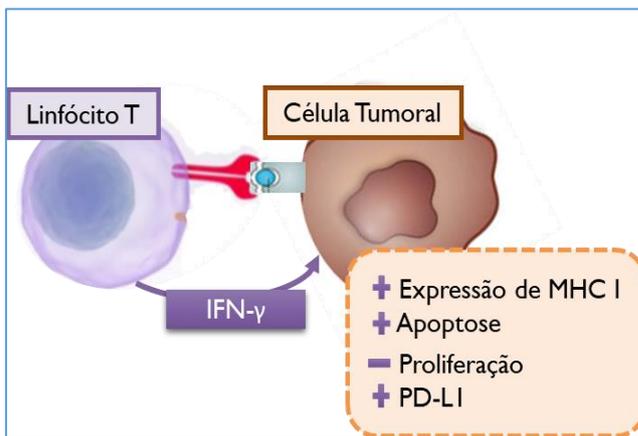


Figura 4 – Principais efeitos do IFN- γ na célula tumoral, após ser produzido pelo linfócito T ao reconhecer o seu antigénio. Criado com base na descrição presente em (16)

de induzir efeitos pró-apoptóticos e anti-proliferativos nas células tumorais (figura 4). Deste modo, quando a via de sinalização do IFN- γ está alterada, as células tumorais tornam-se insensíveis aos referidos efeitos do IFN- γ dos TIL, o que favorece a sua evasão ao SI. É de notar que a expressão adaptativa de PD-L1 induzida pelo IFN- γ fica também comprometida, pelo que, de todas as estratégias de imunoterapia, este mecanismo de resistência afeta especialmente a resposta à terapêutica anti-PD-1/PD-L1 (16).

Por fim, o IPRES (Innate Anti-PD-1 Resistance Signature) é um mecanismo de resistência inata aos anti-PD1, reconhecido por Hugo *et al.*, e consiste numa assinatura transcriptómica que reflete a sobreexpressão concomitante de um conjunto de 26 genes. Estes genes estão envolvidos na regulação da transição mesenquimal, que traduz a plasticidade fenotípica das células tumorais, e na imunossupressão, quimiotaxia de monócitos e macrófagos, angiogénese, remodelação da matriz extracelular e cicatrização de feridas. Esta assinatura do transcriptoma foi identificada em melanomas não sensíveis à terapêutica com inibidores do PD-1, tendo sido detetada também noutros tumores, como nos adenocarcinomas pancreático ou do pulmão ou no carcinoma das células renais, resistentes a esta imunoterapia (21).

3.1.2. Fatores de Resistência Extrínsecos ao Tumor

O microambiente tumoral é um local onde ocorrem complexas interações entre o tumor e as células do sistema imunitário associadas ao tumor, conferindo um ambiente imunossupressor propício ao desenvolvimento das células tumorais (15).

A presença de células do sistema imunitário com ação imunossupressora no microambiente tumoral, sobretudo linfócitos Treg, células supressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSC) e macrófagos associados ao tumor (TAM), é um dos fatores correlacionados com a resistência à imunoterapia. Os linfócitos Treg inibem a resposta imune mediada pelos linfócitos T efetores através da secreção de citocinas imunossupressoras (IL-10 e TGF- β), do consumo de IL-2 e, indiretamente, pela expressão de CTLA-4. Por sua vez, as MDSC são um grupo heterogéneo de células responsáveis pela indução da atividade dos linfócitos Treg e pela forte

supressão dos linfócitos T efetores, resultante da produção de citocinas imunossupressoras, da depleção de aminoácidos essenciais à função dos TIL ou pela nitração dos TCR dos TIL, estando, ainda, associadas à promoção da angiogénese. Quanto aos TAM, estes incluem dois tipos distintos: os macrófagos M1 e os M2. Os M1 promovem a resposta imune inata, enquanto os M2 inibem a atividade dos TIL, diretamente, através da expressão de PD-L1, ou indiretamente, pelo recrutamento de Treg (22).

No microambiente tumoral existem diversas moléculas libertadas pelo tumor ou por células do sistema imunitário que, devido à sua ação imunossupressora, concorrem para a resistência à imunoterapia, entre as quais se incluem citocinas inibitórias (IL-10, TGF-β, VEGF entre outras), metabolitos resultantes da ação da IDO e a adenosina (16). Relativamente à IDO, esta é uma enzima presente nas células tumorais e nas APC, cuja expressão é induzida pelo IFN-γ, e é responsável pelo catabolismo do triptofano, dando origem a metabolitos imunossupressores que são secretados para o microambiente tumoral, dos quais se destaca a quinurenina. Sendo o triptofano um aminoácido essencial para as células, a redução dos seus níveis no microambiente tumoral, aliada à ação dos seus metabolitos, culmina na inibição da proliferação e da atividade dos TIL (23). Quanto à adenosina, esta resulta da desfosforilação do AMP pela ecto-enzima CD73, expressa em diversos tipos de tumor. No microambiente tumoral, a adenosina liga-se ao seu recetor A2A nos linfócitos T, inibindo a sua proliferação e a sua ação citotóxica e promove a formação de metástases quando se liga ao recetor A2B nas células tumorais. Assim, os tumores que sobreexpressam a CD73 conduzem a um aumento de adenosina no microambiente tumoral, fomentando a resistência à imunoterapia (24).

Outro fator extrínseco de resistência é a exaustão de linfócitos T, um estado disfuncional caracterizado pela expressão sustentada de CI e pela perda da sua função efetora, sendo um

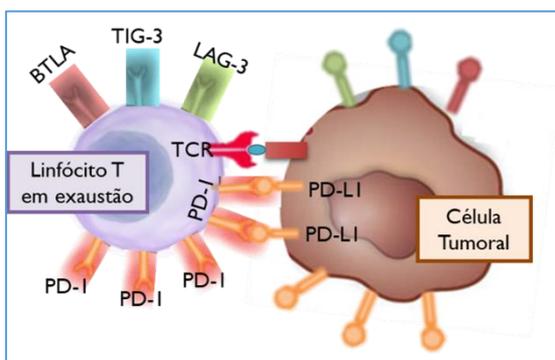


Figura 5 – Exaustão de linfócitos T devida à elevada expressão de PD-1 e à co-expressão de múltiplos inibidores do *checkpoint* imunitário. Adaptado de (15)

mecanismo de resistência inata ou adquirida. Na sequência da exposição contínua aos antígenos tumorais, os TIL sobreexpressam o PD-1 que, ao ligar-se ao PD-L1 das células tumorais, leva a que os linfócitos T adquiram um fenótipo fortemente marcado pela redução da proliferação, da sobrevivência e da atividade citotóxica e inflamatória. Quando os TIL se encontram num estado de exaustão severa, a expressão de PD-1 é de tal modo elevada que a eficácia da terapêutica anti-PD-1/PD-L1 é limitada, ao invés

do que ocorre quando a expressão de PD-1 é moderada (exaustão parcial), pois neste caso a terapêutica permite reverter o ligeiro estado de exaustão funcional. A severidade da exaustão e a sensibilidade dos TIL aos inibidores do PD-1/PD-L1 é, assim, condicionada pelo nível de expressão de PD-1 e pela abundância de PD-L1. Por outro lado, a sobreexpressão de múltiplos CI para além do PD-1, como o CTLA-4, o TIM-3 e o LAG-3, está também associada ao fenótipo de exaustão dos TIL (figura 5), pelo que o padrão dos diversos CI e o nível de expressão de cada um podem condicionar a reversão da exaustão (25).

3.2. Resistência Adquirida

Apesar da imunoterapia ter como apanágio a capacidade de induzir respostas bastante duradouras, foram já identificados mecanismos de resistência adquirida, que resultaram na recidiva de doentes a quem a terapêutica até então surtia efeito. Por este motivo, estima-se que cerca de um quarto a um terço dos doentes com melanoma metastático possa recidivar durante o tratamento com inibidores do CI (16). A resistência adquirida pode ser consequência natural da pressão imunológica, que pressupõe a seleção e a proliferação dos clones pré-existentes que são resistentes à imunoterapia, em detrimento dos sensíveis, ou pode advir de alterações nas células tumorais, adquiridas durante a imunoterapia (26).

Um dos mecanismos de resistência adquirida à imunoterapia pode consistir no decréscimo da expressão de neoantigénios, como resultado da eliminação das células tumorais ricas em neoantigénios pelos TIL e na subsequente proliferação das restantes células tumorais pobres em neoantigénios (15). Outro mecanismo pode corresponder a deleções, mutações ou alterações epigenéticas nos genes que codificam os neoantigénios ou os antigénios associados ao tumor, pois os TIL não reconhecem as células tumorais, uma vez que estas já não exibem os antigénios para os quais são específicos (16).

Ademais, a imunoterapia pode induzir mutações nos genes *JAK1*, *JAK2* e *β 2M*, por exemplo, que se repercutem na evasão do tumor ao sistema imunitário. Para além de estar associada à resistência primária e adaptativa, a existência de mutações nos genes *JAK1* e *JAK2* foi descoberta como sendo um mecanismo de resistência adquirida à terapêutica anti-PD-1 com pembrolizumab, em doentes com melanoma. As mutações nestes genes afetam a via de sinalização do IFN- γ , tornando o tumor menos sensível aos efeitos danosos desta molécula produzida pelos linfócitos T citotóxicos. Do mesmo modo, mutações no gene que codifica a *β 2M* estão associadas aos três tipos de resistência, e sendo a *β 2M* essencial para a apresentação de antigénios, estas culminam num menor reconhecimento das células tumorais pelos TIL (27).

4. Imunoterapia Combinada

Com o intuito de ultrapassar as resistências do tumor à imunoterapia, a imunoterapia combinada baseia-se na combinação sinérgica de diferentes estratégias de imunoterapia ou de uma imunoterapia com uma terapêutica convencional, de modo a atuar em diferentes etapas do ciclo cancro-sistema imunitário (SI) e, assim, contornar resistências associadas às etapas em causa (28). Deste modo, a imunoterapia combinada visa tornar sensíveis os doentes que eram resistentes à imunoterapia (aumentar a taxa de resposta) ou melhorar a qualidade das respostas nos doentes que já respondiam a este tipo de terapêutica (29). Atualmente estão já aprovadas duas combinações e decorrem centenas de ensaios clínicos (EC) de imunoterapia combinada, denotando a forte aposta nesta área como futuro da imunoterapia para o cancro.

Dado que os inibidores do CI em regime de monoterapia são reconhecidos pela sua notável ação anti-tumoral para diversos tipos de cancro e pelo seu perfil de segurança favorável, são tidos como a estratégia de base da imunoterapia combinada, razão pela qual a esmagadora maioria das combinações em estudo é entre inibidores do CI e outras terapêuticas (29).

4.1. Racional das Diferentes Combinações com Inibidores do CI

Os inibidores do CI estão a ser estudados em combinação com diferentes terapêuticas que atuam numa das sete etapas do ciclo cancro-SI, com vista a ultrapassar resistências inerentes a essas etapas e a restaurar a resposta imune anti-tumoral. A [tabela 3](#), em anexo, inclui uma pequena seleção dos ECs em execução de combinações com inibidores do CI já aprovados. A [figura 6](#) indica em que etapa do ciclo cancro-SI atua cada uma das estratégias terapêuticas com as quais os inibidores do CI estão a ser estudados em combinação e que, a seguir, abordarei.

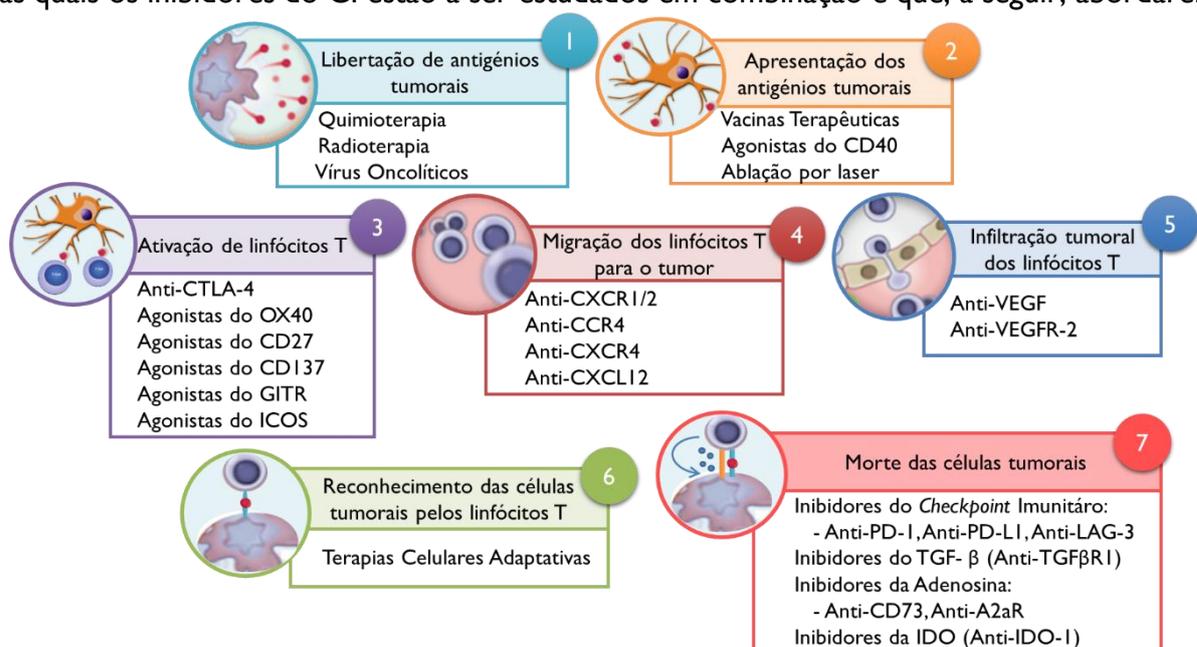


Figura 6 – Etapas-alvo de cada estratégia usada em combinações. Modificado de (28)

4.1.1. Aumentar a Libertação de Antígenos Tumorais

A sensibilidade à imunoterapia com inibidores do CI pode ser aumentada pela combinação com terapêuticas que promovem a liberação de antígenos tumorais, tal como é o caso das terapêuticas convencionais de quimioterapia e radioterapia (28), assim como da imunoterapia com vírus oncolíticos (30). Estas estratégias induzem a morte imunogénica das células tumorais e a consequente liberação de antígenos tumorais e de DAMPs, como o IFN do tipo I, o ATP e a calreticulina. Estes DAMPs ligam-se aos seus recetores expressos nas APC, tais como os recetores *Toll-like* (TLRs), estimulando a maturação destas células e, em conjunto com o aumento do *pool* de antígenos tumorais disponíveis para serem apresentados, é estimulada a apresentação destes antígenos aos linfócitos T *naive*, pelo que, em combinação com inibidores do CI, a resposta imune anti-tumoral é amplificada (31). Estes tipos de imunoterapia combinada são particularmente benéficos para tumores pouco imunogénicos, pois a sua capacidade em induzir o desenvolvimento de linfócitos T específicos para o tumor é limitada, pelo que uma forma de aumentar a sua imunogenicidade é recorrer ao aumento da liberação de antígenos tumorais (15).

Para as combinações de quimioterapia ou radioterapia com o ipilimumab foram já reportadas apenas ligeiras melhorias da eficácia, ao conferirem, respetivamente, um aumento de 2 meses (32) e de 1 mês (33) na sobrevivência global, sendo que no caso da quimioterapia o regime combinatório aumentou significativamente a toxicidade. Porém, este panorama pouco animador poderá inverter-se, tendo em conta que se encontra a decorrer um grande número de ECs destas terapêuticas com diversos inibidores do CI, em particular com anti-PD-1 ou anti-PD-L1 (tabela 3, em anexo) e, como prova, no presente ano, foi já concedida aprovação a uma combinação entre um regime de quimioterapia e um inibidor do PD-1 (tabela 1, em anexo).

Os vírus oncolíticos são um tipo de imunoterapia que atua através da sua replicação seletiva nas células tumorais, tirando partido de vias de sinalização anormais destas células, o que culmina na sua lise imunogénica. Como resultado, são libertadas partículas virais que infetam as células tumorais adjacentes, bem como PAMPs, DAMPs e citocinas, assim como antígenos tumorais que ao serem apresentados a linfócitos T *naive* induzem uma resposta imune anti-tumoral sistémica. Os vírus oncolíticos podem ser modificados geneticamente de modo a atenuar a sua patogenicidade e também para potenciar a resposta imune anti-tumoral por eles despoletada, como é o caso do único vírus oncolítico aprovado, o T-VEC (Imlygic®), que contém um gene que codifica o fator estimulador de colónias granulócito-macrófago (GM-

CSF) (34,35). Este fator possui propriedades quimiotáticas que se refletem na atração, maturação e ativação das DC, podendo estimular a apresentação de antígenos (34).

A combinação do T-VEC com o ipilimumab encontra-se num EC de fase Ib/II para o melanoma avançado, que tem demonstrado um bom perfil de segurança e uma eficácia bastante superior à do T-VEC e à do ipilimumab em monoterapia, tendo sido obtida uma taxa de resposta e uma progressão livre de doença de 50%, e uma sobrevivência global de 67% aos 18 meses (36). Dado que os vírus oncolíticos induzem a libertação de IFN que, por sua vez, induz a expressão de PD-L1 nas células tumorais, a combinação de vírus oncolíticos com inibidores do PD-1/PD-L1 pode ser particularmente benéfica (34) e, de facto, o T-VEC encontra-se em ECs com o pembrolizumab para três indicações terapêuticas. Ademais, os inibidores do CI estão em ECs com vírus oncolíticos ainda não aprovados (tabela 3, em anexo).

4.1.2. Estimular a Apresentação de Antígenos Tumorais

A vacinação é outro tipo de imunoterapia que está a ser ensaiada em combinação com inibidores do CI, também com especial relevância para tumores pouco imunogénicos, pois promove diretamente a apresentação de antígenos tumorais pelas APC aos linfócitos T *naive*, de modo a aumentar o repertório de linfócitos T envolvidos na resposta imune anti-tumoral (29). Tal como se encontra demonstrado na tabela 3 (anexo), as estratégias de vacinação em ECs com inibidores do CI podem corresponder a: 1) vacinas peptídicas de antígenos tumorais, como são os exemplos da vacina constituída por 6 peptídeos *helper* do melanoma (6MHP) ou a vacina de neoantígenos NeoVax; 2) vacinas de vírus recombinantes atenuados que codificam antígenos tumorais, como é o caso da PROSTVAC, uma vacina constituída por um poxvírus que codifica o antígeno específico da próstata (PSA) e um conjunto de três moléculas co-estimulatórias, designadas TRICOM (37); 3) vacinas celulares autólogas, que podem corresponder a vacinas de células tumorais geneticamente modificadas, como a GVAX ou a Vigil[®], ou a vacinas de DCs geneticamente modificadas, como é o caso do Sipuleucel-T (Provenge[®]), a única vacina aprovada para o cancro, designadamente para o da próstata (tabela 1, em anexo). Destas, é de notar que a combinação sipuleucel-T + ipilimumab revelou, num EC de fase I, ser bem tolerada (38) e encontra-se, hoje, na fase II com a referida combinação e em fase I com o atezolizumab (tabela 3, em anexo).

Por outro lado, os inibidores do CI estão em estudo com mAc que atuam como agonistas do recetor CD40 expresso nas APC, pois esta imunoterapia tem o fim de estimular a ativação das APC e de induzir a expressão de moléculas co-estimulatórias nestas células, o que, em última análise, estimula a apresentação de antígenos aos linfócitos T (39). Num EC de fase I,

o mAc CP-870,893 demonstrou uma boa tolerabilidade e uma taxa de resposta de 27,3% em combinação com o anti-CTLA-4 tremelimumab (não aprovado), para o melanoma (40).

Uma nova abordagem combinatória diz respeito à ablação por laser guiada por ressonância magnética (RM) em combinação com o pembrolizumab para o glioblastoma (tabela 3, em anexo). A ablação por laser guiada por RM é uma tecnologia aprovada pela FDA para procedimentos neurocirúrgicos e recorre à incidência de luz laser no tumor para, através de energia térmica, provocar o rápido aquecimento do local, culminando na sua destruição celular (41). Para além de destruir o tumor, esta técnica causa a disrupção da barreira hematoencefálica nesse local, permitindo, por um lado, que os antígenos tumorais atinjam o sistema linfático onde são apresentados pelas APC e, por outro, que as células efetoras do sistema imunitário acedam ao tumor para que se exerça uma resposta imune contra as células tumorais remanescentes. Assim, a ablação por laser permite estimular a apresentação de antígenos tumorais e o anti-PD-I potencia a resposta imune desencadeada (42).

4.1.3. Promover a Ativação de Linfócitos T

A combinação entre dois inibidores do CI e entre inibidores do CI e agonistas co-estimulatórios são abordagens que em sinergia estimulam a ativação de linfócitos T. O racional da combinação entre anti-PD-I/PD-LI e anti-CTLA-4 assenta no facto de os anti-CTLA-4 atuarem numa fase mais precoce do ciclo cancro-sistema imunitário do que os anti-PD-I/PD-LI, que atuam a jusante, na fase efetora, não sendo redundantes. Assim, enquanto os CTLA-4 estimulam a ativação de linfócitos T e reduzem a ação imunossupressora dos linfócitos Treg, os anti-PD-I/PD-LI impedem a inibição da atividade dos TIL (11). A combinação do anti-CTLA-4 ipilimumab com o anti-PD-I nivolumab já se encontra aprovada para o melanoma (tabela 1 em anexo) e está em ECs para outras indicações, estando ainda em ECs a combinação do anti-PD-LI durvalumab com o anti-CTLA-4 tremelimumab, para diversos tipos de cancro.

A ativação de linfócitos T pode ser promovida, ainda, pela combinação de inibidores do CI com agonistas co-estimulatórios. Estes agonistas correspondem a mAc específicos para recetores co-estimulatórios presentes à superfície dos linfócitos T, entre os quais o OX40, o CD27, o CD137 (4-1BB), o GITR e o ICOS (figura 7), pelo que contribuem para o aumento do *ratio* entre sinais co-estimulatórios e co-inibitórios, favorecendo a ativação de linfócitos T, para além de poderem promover a sua atividade efetora (pró-inflamatória e citotóxica). Dado que alguns destes recetores são, também, expressos em linfócitos Treg e/ou em linfócitos NK, a ação dos seus agonistas pode refletir-se na restrição da atividade imunossupressora dos linfócitos Treg e no aumento da citotoxicidade celular dependente de anticorpos mediada

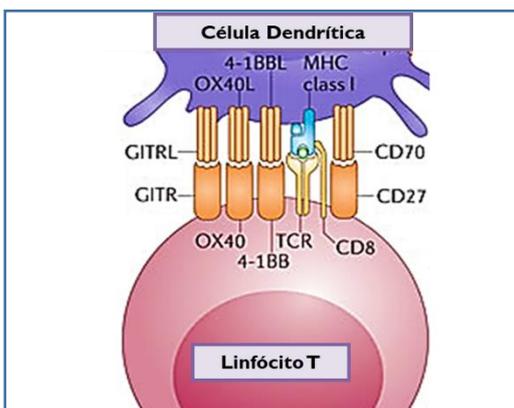


Figura 7 – Receptores co-estimulatórios expressos nos linfócitos T e respetivos ligandos nas células dendríticas. Adaptado de (44)

pelos linfócitos NK (43). Os ECs que combinam agonistas co-estimulatórios e inibidores do CI estão, ainda, nas fases iniciais (tabela 3, em anexo), sendo que a combinação do atezolizumab (anti-PD-L1) e o agonista anti-OX40 MOXR0916 demonstrou preliminarmente uma boa tolerabilidade num EC de fase Ib, estando agora na fase de expansão (45), e a combinação do nivolumab (anti-PD-I) e o agonista anti-CD27 varlilumab revelou ser bem tolerada e ter atividade clínica em doentes cujos tumores são tipicamente resistentes aos anti-PD-I em monoterapia (46).

4.1.4. Estimular a Migração de Linfócitos T e Inibir a Migração de MDSC e Treg

O recrutamento de linfócitos T efetores até ao tumor é mediado pelo efeito de algumas quimiocinas produzidas pelas células tumorais, tais como as CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 e CXCL12 (47). Porém, nesta etapa do ciclo cancro-sistema imunitário são também recrutadas células imunossupressoras, como as MDSCs e os linfócitos Treg, que inibem a atividade dos linfócitos T citotóxicos, limitando a eficácia da resposta imune anti-tumoral. Por conseguinte, a inibição dos receptores das quimiocinas responsáveis pela sua migração até ao tumor é uma estratégia que está a ser estudada em combinação com inibidores do CI, mas ainda sem resultados reportados (28). Tal como indicado na tabela 3 (em anexo), estão a ser combinados antagonistas dos receptores CXCR1 e CXCR2 presentes nas MDSC, antagonistas do recetor CCR4 expresso em níveis elevados nos linfócitos Treg, para além dos antagonistas do CXCR4 e do CXCL12. A ligação do CXCL12 ao seu recetor CXCR4 resulta na atração de linfócitos T efetores, num fenómeno dependente da concentração de CXCL12, pois quando esta é baixa atrai os linfócitos T efetores, porém quando é elevada repele-os (“*leucocyte fugetaxis*”), estando a forte presença de CXCL12 também associada à migração de linfócitos Treg, pelo que estes fatores justificam os ECs com anti-CXCR4 ou anti-CXCL12 com o fim de estimular a migração de linfócitos T efetores e inibir a de Treg (47).

4.1.5. Promover a Infiltração Tumoral de Linfócitos T

A infiltração tumoral de linfócitos T é uma etapa determinante para que o microambiente tumoral contenha um número de linfócitos T suficiente para despoletar uma resposta anti-tumoral eficaz, podendo ser condicionada pela ação inibitória do VEGF, expresso pelas células

tumorais. Para além de favorecer a proliferação do tumor devido às suas propriedades pró-angiogénicas, o VEGF conduz à sub-expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, o que resulta na redução do influxo de linfócitos T e de DCs para o microambiente tumoral (47). A ação imunossupressora do VEGF inclui, ainda, a estimulação de linfócitos Treg, a acumulação de MDSCs, a inibição da maturação das DC e a indução da expressão de PD-L1 e de outros CI nos TIL, contribuindo para a sua exaustão (48).

O anti-VEGF bevacizumab (Avastin®) está a ser estudado em combinação com diversos inibidores do CI e para diferentes tipos de cancro, sendo de destacar os resultados obtidos num EC de fase II com o anti-PD-L1 atezolizumab para o carcinoma das células renais (RCC), que revelaram, nos doentes que expressam PD-L1, um aumento da progressão livre de doença para quase o dobro com a combinação, relativamente ao sunitinib, e uma taxa de resposta de 46% vs. 27%, respetivamente, bem como um perfil de segurança consistente com o registado para cada monoterapia, estando agora na fase III (49). Por outro lado, o inibidor do recetor do VEGF (VEGFR-2) ramucirumab está também a ser estudado em combinação com inibidores do CI em diversos EC e para diversos tipos de cancro (tabela 3, em anexo).

4.1.6. Aumentar o Reconhecimento das Células Tumorais pelos Linfócitos T

As terapias celulares adaptativas (ACT) são um tipo de imunoterapia que pode ser combinada com inibidores do CI com o intuito de aumentar o número de TILs aptos a reconhecer antígenos tumorais. As ACT consistem no isolamento de linfócitos T retirados do sangue periférico ou do tumor, na sua posterior manipulação *ex vivo* e na sua reinfusão no doente. Um dos tipos de ACT recorre à recolha dos TIL e na sua expansão *ex vivo*, através de citocinas, ao passo que os restantes tipos recorrem a linfócitos T retirados do sangue periférico e à sua manipulação genética de modo a expressarem TCRs ou CARs (*Chimeric Antigen Receptor*) específicos para os antígenos tumorais. A utilização da ACT com CARs em detrimento de TCRs tem como vantagem o facto de os CAR corresponderem a fragmentos variáveis de cadeia única (scFv) de anticorpos que reconhecem antígenos tumorais extracelulares de uma forma que não depende da apresentação por moléculas MHC (43,50). Como tal, a ACT com CARs pode ser empregue a tumores que contenham defeitos na maquinaria de apresentação de antígenos ou na $\beta 2M$ como mecanismo de resistência (43).

Os ECs de combinações entre ACT e inibidores do CI ainda são escassos e encontram-se nas suas fases iniciais, sendo de notar que alguns ECs estudam os efeitos da administração dos inibidores do CI antes da ACT (ex: NCT03215810) e outros após a ACT (ex: NCT02757391), pelo que no futuro poderão retirar-se ilações quanto à ordem de administração (tabela 3).

4.1.7. Promover a Morte das Células Tumorais Mediada pelos Linfócitos T

Tanto as células tumorais como o microambiente tumoral têm mecanismos que contribuem para a evasão do tumor à morte mediada pelos TIL, pelo que a inibição destes mecanismos é vista como uma estratégia atrativa para combinações com inibidores do CI.

A expressão de PD-L1 pelas células tumorais é um dos fatores que reduz a suscetibilidade do tumor à ação dos linfócitos T citotóxicos, visto que a interação entre o PD-1 e o PD-L1 inibe a secreção de mediadores inflamatórios e citotóxicos por estes linfócitos. Deste modo, a combinação entre inibidores do CTLA-4 e PD-1/PD-L1 não só estimula a ativação dos linfócitos T, como também potencia a morte das células tumorais mediada pelos TIL (11).

Outra estratégia consiste na combinação com outros tipos de inibidores do CI, ainda não aprovados, tais como os mAc contra o LAG-3, o TIM-3, o TIGIT ou o BTLA, visto que estes CI se encontram expressos à superfície dos linfócitos T em exaustão (25). Destas, a combinação de anti-PD-1 com anti-LAG-3 é a única que se encontra em ECs e assume particular interesse, uma vez que o PD-1 e o LAG-3 são sobretudo expressos nos TIL, pelo que o seu bloqueio deverá potenciar a função efetora destes linfócitos e ter impacto apenas na resposta anti-tumoral, resultando possivelmente num melhor perfil de segurança (28). Um EC de fase I/II entre o nivolumab e o anti-LAG-3 BMS-986016 revelou uma taxa de resposta de 12,5% em doentes com melanoma refratários aos anti-PD-1/PD-L1 e um perfil de segurança semelhante ao do nivolumab em monoterapia (51).

A inibição de moléculas do microambiente tumoral que impedem a ação citotóxica e pró-inflamatória dos linfócitos T pode também ser combinada com inibidores do CI. Um caso consiste na utilização de inibidores do TGF- β , dado que esta é uma citocina imunossupressora que estimula os linfócitos Treg e reprime a atividade dos linfócitos T efetores (16), pelo que, atualmente, o inibidor do recetor do TGF- β (TGF β RI) galunisertib está em ECs com o nivolumab e com o durvalumab (tabela 3, em anexo). Outra molécula que pode ser alvo de inibição é a adenosina, visto que ao ligar-se ao seu recetor A2A impede a proliferação e a ação citotóxica dos linfócitos T (24), sendo que se pode recorrer a anti-CD73 para bloquear a sua produção pela ecto-enzima CD73, ou a antagonistas do seu recetor A2A. Estas estratégias estão em ECs com o durvalumab e com o atezolizumab, respetivamente (tabela 3). Por seu turno, o uso de anti-IDO evita a depleção de triptofano e a acumulação do seu metabolito imunossupressor e, assim, permite a proliferação e a função dos TIL (23). Esta é uma opção auspiciosa, sobretudo no que toca ao epacadostat, pois este participa num grande número de ECs com diversos inibidores do CI e para diferentes indicações terapêuticas (tabela 3).

4.2. Combinações Aprovadas com Inibidores do CI

Atualmente existem apenas duas imunoterapias combinadas aprovadas: a combinação entre o ipilimumab e o nivolumab, pela FDA e pela EMA, e a combinação entre o pembrolizumab e o regime de quimioterapia pemetrexed e carboplatina, pela FDA (tabela 1, em anexo).

4.2.1. Combinação Ipilimumab + Nivolumab

A primeira imunoterapia combinada aprovada diz respeito à combinação entre o anti-CTLA-4 ipilimumab (Yervoy[®]) e o anti-PD-1 nivolumab (Opdivo[®]), ambos da Bristol-Myers Squibb, para o melanoma avançado.

Os resultados do EC de fase III *CheckMate 067* demonstraram uma melhor eficácia para a combinação do que para o ipilimumab ou nivolumab em monoterapia, na medida em que a média da sobrevivência livre de progressão foi de 11,5 meses com a combinação, enquanto com o ipilimumab foi de 2,9 meses e com o nivolumab de 6,9 meses. A taxa de resposta foi também superior para a combinação do que para as monoterapias (57,6% vs. 19,0% para o ipilimumab e 43,7% para o nivolumab) (52). Estes dados comprovam que os mecanismos de ação dos anti-CTLA-4 e anti-PD-1 são, de facto, sinérgicos, pois os anti-CTLA-4 promovem a ativação de diversos linfócitos T, o que permite aumentar o número de linfócitos T efetores que migram até ao tumor, e os anti-PD-1 inibem a supressão da atividade destes linfócitos no microambiente tumoral (11).

É de realçar que esta combinação é especialmente benéfica nos doentes cujos tumores não expressam o ligando PD-L1. Enquanto para os tumores PD-L1 positivos a sobrevivência livre de progressão foi semelhante com a combinação e com o nivolumab (14,0 meses) e inferior com o ipilimumab (3,9 meses), para os doentes com tumores PD-L1 negativos este indicador foi consideravelmente superior com a combinação do que com o nivolumab ou ipilimumab (11,2 meses vs. 5,3 e 2,8 meses, respetivamente) (52). Tal advém do facto de o efeito do anti-CTLA-4 resultar numa maior infiltração tumoral de linfócitos T efetores o que, por conseguinte, aumenta o reconhecimento das células tumorais pelos TIL e induz, através do IFN- γ , a expressão de PD-L1 em tumores que até então eram PD-L1 negativos. Assim, dado que a ligação do PD-1 dos linfócitos T ao PD-L1 do tumor é um pré-requisito para que os anti-PD-1 apresentem eficácia, a combinação entre estes dois inibidores do CI permite obter um aumento particularmente significativo da resposta em tumores que não expressam PD-L1 (PD-L1 negativos) (20).

Apesar destes efeitos positivos, foi registado um maior número de efeitos adversos de graus 3 ou 4 com a combinação (55,0%) do que com o nivolumab (16,3%) ou o ipilimumab (27,3%). De facto, ao inibirem efeitos essenciais à tolerância periférica e à limitação da intensidade da resposta imune, os inibidores do CI podem ser causadores de efeitos adversos imuno-mediados, pelo que, do mesmo modo que os efeitos terapêuticos são potenciados com a combinação, também os adversos o são. Porém, é de notar que muitos dos efeitos adversos foram facilmente tratados conforme indicado pelas *guidelines* e os mais graves foram resolvidos recorrendo a fármacos imunossuppressores (52).

Com base nos resultados deste EC, tanto a FDA (53) como a EMA (54) consideraram o benefício da combinação ipilimumab + nivolumab superior ao risco, tendo aprovado esta imunoterapia combinada, em 2015 e em 2016, respetivamente.

4.2.2. Combinação Pembrolizumab + Pemetrexed e Carboplatina

Em Maio do presente ano foi aprovada, pela FDA, a segunda imunoterapia combinada, que diz respeito à combinação do pembrolizumab com o regime de quimioterapia pemetrexed e carboplatina, como terapêutica de 1ª linha do NSCLC metastático, independentemente da expressão de PD-L1 (55).

A aprovação teve em consideração os resultados do EC de fase II *KEYNOTE-021*, que revelaram uma taxa de resposta quase duas vezes superior com a combinação, em relação à obtida com o regime de quimioterapia (55% vs. 29%), assim como uma média de sobrevivência livre de progressão de 13 meses com a combinação e de 8,9 meses com o pemetrexed e carboplatina. Relativamente à segurança, o EC não foi desenhado com o intuito de demonstrar uma diferença estatisticamente significativa entre a combinação e a quimioterapia, porém pôde verificar-se uma taxa de efeitos adversos ligeiramente superior com a combinação (55).

É de ressaltar que a aprovação desta combinação está a dar aso a alguma controvérsia pelo facto de ser indicada para o NSCLC independentemente da expressão de PD-L1, pois ao não requerer identificação de biomarcadores, em especial de PD-L1, não caminha no sentido da medicina personalizada, podendo incorrer-se no risco de ser administrada a combinação em doentes que poderiam beneficiar mais de outro tipo de terapêutica (56).

4.3. Os Inibidores do CI Mais Utilizados na Imunoterapia Combinada

Os inibidores do PD-1 já aprovados (nivolumab e pembrolizumab) são os inibidores do CI mais utilizados em combinação com outras imunoterapias ou com terapêuticas convencionais em ECs. Este maior interesse deve-se à eficácia e ao perfil de segurança bastante positivos

registados com os anti-PD-I em regime de monoterapia, não só para o melanoma, mas também para outros tumores (29).

Relativamente aos anti-CTLA-4, os anti-PD-I têm demonstrado uma melhor eficácia, tal como se observa pelo exemplo do anti-PD-I pembrolizumab, que obteve, para o melanoma avançado, uma maior taxa de resposta (33,7% vs. 11,9%) e uma maior taxa de progressão livre de doença, comparativamente ao anti-CTLA-4 ipilimumab (47,3% vs. 26,5%). Quanto ao perfil de segurança, neste mesmo exemplo, foi mais favorável para o pembrolizumab, com uma ocorrência de efeitos adversos severos de 13,3% vs. 19,9% (57), o que se depreende pelos anti-CTLA-4 atuarem numa etapa mais precoce do ciclo cancro-sistema imunitário, do que os anti-PD-I/PD-L1 (17). Ademais, enquanto o ipilimumab está aprovado apenas para o melanoma, os anti-PD-I estão indicados não só para o melanoma, mas ainda para o NSCLC, carcinoma celular renal, HNSCC, linfoma de Hodgkin e carcinomas urotelial e colo-retal (tabela 1, em anexo). Todos estes fatores podem concorrer para o facto de o nivolumab e o pembrolizumab serem inibidores do CI mais atrativos para combinações do que o ipilimumab.

Por outro lado, uma vez que alguns tumores podem expressar o ligando PD-L2, do ponto de vista teórico é expectável que os anti-PD-I tenham vantagem sobre os anti-PD-L1, pois os anti-PD-I impedem a ligação do PD-L1 e do PD-L2 ao PD-I, ao passo que os anti-PD-L1 apenas evitam a interação do PD-L1 ao seu recetor (58). Este poderá ser um fator que contribui para um menor número de ECs de imunoterapia combinada com anti-PD-L1, associado ao facto de os três anti-PD-L1 já aprovados, atezolizumab, durvalumab e avelumab, terem sido os últimos a entrar no mercado (tabela 1, em anexo), pelo que ainda não estão incluídos em tantos ECs como estão o nivolumab e o pembrolizumab.

4.4. A Determinação de Biomarcadores e a Terapêutica Personalizada

A resposta à imunoterapia para o cancro não é homogénea para todos os tipos de tumor nem para todos os doentes com um dado tipo de tumor, devido à grande variabilidade nas características das células tumorais e nas interações cancro-sistema imunitário. Deste modo, a determinação de biomarcadores que permitam caracterizar o tumor e o seu microambiente poderá permitir a definição de uma imunoterapia para o cancro personalizada para cada doente, isto é, definir qual a imunoterapia em regime de monoterapia ou combinada que será mais adequada para cada caso. Para tal, será essencial um desenvolvimento racional dos ECs de imunoterapia combinada, com a avaliação de diversos biomarcadores antes e durante o EC, de modo a que sejam obtidos dados que, no futuro, permitam guiar a seleção da terapêutica para cada doente (59).

4.4.1. PD-L1, Linfócitos T de Infiltração Tumoral (TIL) e Carga Mutacional

Os três principais biomarcadores da resposta à imunoterapia com inibidores do PD-1/PD-L1 que têm sido propostos são a expressão tumoral do ligando PD-L1, a presença de TILs e a carga do tumor em mutações (figura 8), pelo que a sua determinação poderá indicar, ou não, a necessidade de uma combinação (60).

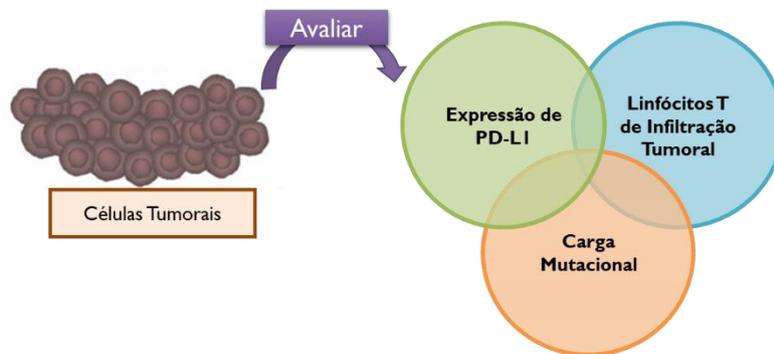


Figura 8 – A determinação conjunta da expressão de PD-L1, da presença de linfócitos T de infiltração tumoral e da carga mutacional do tumor poderá ser preditiva da resposta aos inibidores do PD-1/PD-L1 e, assim, útil para avaliar a necessidade de combinações. Adaptado de (60)

A sensibilidade aos inibidores do PD-1/PD-L1 está dependente não só da expressão de PD-L1 pelo tumor, mas também da presença de linfócitos T no microambiente tumoral, pois é a ligação do PD-1 destes linfócitos ao PD-L1 do tumor, o alvo deste tipo de imunoterapia. Por conseguinte, as avaliações quanto à sensibilidade à monoterapia devem ser retiradas avaliando-se o biomarcador PD-L1 em conjunto com um segundo biomarcador, a presença de TILs (20). Em função da presença ou ausência de TILs e do nível de expressão de PD-L1, os tumores podem ser classificados em 4 tipos (61):

1) No caso dos tumores do tipo I (PD-L1 positivos e TIL positivos), os dois requisitos para a resposta aos inibidores do PD-1/PD-L1 estão presentes, pelo que não deverá ser necessário combinar estes inibidores do CI com outra imunoterapia (59,61), pois tal poderia resultar num potencial aumento dos efeitos adversos severos e dos custos (61).

2) Por seu turno, os tumores do tipo II (PD-L1 negativos e TIL negativos) são aqueles que mais frequentemente não respondem aos anti-PD-1/PD-L1. Estes casos requerem uma imunoterapia combinada que permita aumentar a presença de TILs e, simultaneamente, evitar que estes sejam inibidos pelo PD-L1, que será indutivamente produzido após estes linfócitos reconhecerem o tumor. Deste modo, a combinação ipilimumab + nivolumab pode ser uma opção (20,61), assim como a combinação de anti-PD-1/PD-L1 com outro tipo de estratégias

que possam aumentar o número de linfócitos T específicos para o tumor, presentes no microambiente tumoral, como são os casos da ACT, dos inibidores da angiogênese, dos agonistas co-estimulatórios, das vacinas, da quimioterapia, da radioterapia e dos vírus oncolíticos (59,61).

3) Relativamente aos tumores do tipo III (PD-L1 positivos e TIL negativos), uma vez que os linfócitos T não estão presentes no microambiente tumoral, a expressão de PD-L1 não advém da sua indução pelo IFN- γ , mas sim é uma expressão inata. Estes tumores podem, assim, ser bons alvos para uma imunoterapia combinada com inibidores do PD-1/PD-L1 e estratégias que visem, em última análise, o aumento da infiltração de linfócitos T específicos para o tumor, seguindo-se, assim, o mesmo leque de opções que no tipo II (61).

4) Por fim, nos tumores do tipo IV (PD-L1 negativos e TIL positivos), a presença de um forte microambiente imunossupressor, ou de outros CI que não o PD-1 e/ou de uma reduzida expressão/defeitos na MHC I do tumor, poderá estar na origem da não efetividade dos TIL que, assim, não produzem IFN- γ , o que explica a não expressão de PD-L1 pelo tumor. Nestes casos, a imunoterapia combinada com anti-PD-1/PD-L1 e estratégias que atuem nas células imunossupressoras e em metabolitos como a IDO ou a adenosina, ou que tenham como alvo outros CI, ou a ACT com CARs são opções a considerar (59,61).

A carga mutacional dos tumores é outro parâmetro que deve ser determinado, visto que os tumores que apresentam uma elevada frequência de mutações somáticas têm uma maior propensão para a formação de diversos neoantígenos e, por isso, são mais imunogénicos e mais sensíveis aos inibidores do CI (60). Por estes motivos, para os tumores do tipo II e do tipo III, a escolha da estratégia a combinar deve ter em conta a sua carga mutacional, sendo que se for reduzida, poderá optar-se por combinar inibidores do CI com estratégias que permitam contornar a reduzida imunogenicidade e, assim, aumentar o reportório de linfócitos T ativados, como são as vacinas, a quimioterapia, a radioterapia e os vírus oncolíticos (61).

4.4.2. Imunograma do Cancro

Recentemente, Blanck *et al.* propôs que as interações cancro-sistema imunitário de cada doente devem ser entendidas de uma forma holística e integrativa no que designou de imunograma do cancro, com o intuito de melhor personalizar a terapêutica, avaliando qual a imunoterapia ou a combinação mais adequadas para cada doente. Este imunograma consiste num conjunto de 7 parâmetros, cada um avaliado pela determinação de diferentes biomarcadores: 1) o reconhecimento do tumor como uma entidade “estranha”, através da carga de mutações; 2) o estado geral do sistema imunitário, pela contagem de linfócitos; 3) a

infiltração de células do sistema imunitário, tendo como biomarcador a densidade intratumoral de linfócitos T; 4) a ausência de CI, mediante a expressão de PD-L1 ou de outros CI; 5) a ausência de moléculas solúveis inibitórias, tais como o VEGF, a IDO, ou a IL-6; 6) a ausência do metabolismo inibitório tumoral, avaliando-se a utilização de glucose ou de lactato desidrogenase (LDH); 7) a sensibilidade do tumor às células efectoras do sistema imunitário, pela determinação da expressão de moléculas MHC ou de IFN- γ (62).

4.5. Estabelecimento de Parcerias em Imunoterapia Combinada

Até à chegada da imunoterapia combinada, a realização de ECs de combinações entre fármacos ainda em estado de investigação não era um acontecimento comum. A imunoterapia combinada veio, assim, estabelecer um ponto de viragem pois, ao invés de se desenvolver um medicamento que será aprovado e que, posteriormente, poderá ser testado em combinações, a tendência da imunoterapia combinada passa por encontrar combinações sinérgicas o mais cedo possível, ainda nas fases iniciais de desenvolvimento (63,64).

As diversas combinações de imunoterapias podem ser estabelecidas intra-empresa ou mediante o acordo de parcerias com outras empresas, inter-empresa. No primeiro caso, as *Big Pharma* ensaiam combinações entre imunoterapias que pertençam ao seu *pipeline*, de modo a potenciá-lo ao máximo, porém com as ressalvas de que o número de combinações possíveis é limitado pelo tamanho do seu *pipeline* em imunoterapia e em outras terapêuticas para o cancro e pelo facto de os fármacos em causa poderem nem sempre estar na mesma fase de ECs (63). Como exemplos demonstrativos de combinações intra-*Big Pharma* podem referir-se as combinações entre o ipilimumab e o nivolumab pertencentes à Bristol-Myers Squibb, o pembrolizumab e o anti-GITR MK-1248 da Merck Sharp & Dohme, o atezolizumab com o anti-OX-40 MOXRO916 da Genentech (Roche), ou o durvalumab em combinação com o anti-CTLA-4 tremelimumab, ambos da AstraZeneca, entre outras (tabela 3, em anexo).

Contudo, a grande maioria das combinações em ECs implica, necessariamente, o estabelecimento de parcerias entre as *Big Pharma* e pequenas empresas ou instituições, de modo a ensaiar uma imunoterapia em combinação com um maior leque de opções, pois apesar de as *Big Pharma* poderem ter um *pipeline* com várias imunoterapias, este não contém todas as estratégias com forte potencial para combinações (64). A importância crescente em estabelecer parcerias denota-se pelo número de alianças entre *Big Pharma* e pequenas empresas que aumentou significativamente de 6 em 2013, para 58 em 2015, para além de se contarem, em 2015, 13 parcerias com universidades e centros oncológicos (65).

As combinações que resultam da colaboração entre *Big Pharma* e outras empresas, sobretudo de biotecnologia, podem constituir uma oportunidade para as *Big Pharma* se manterem competitivas e cimentarem a sua posição na linha da frente da imunoterapia combinada, evitando a necessidade de estabelecer dispendiosos e morosos acordos de aquisições e fusões (66) e, simultaneamente, podem constituir um nicho de mercado atrativo para as pequenas empresas (64). Porém, as parcerias apenas se efetuam quando os interesses de ambas as partes se alinham (63).

A realidade das parcerias em imunoterapia combinada transpõe-se em inúmeros exemplos, onde se inclui a parceria efetivada entre a Bristol-Myers Squibb (BSM) e a Celldex para a combinação entre o nivolumab e o anti-CD27 varlilumab, acordando, entre outras condições, o pagamento de 5 milhões de dólares da BSM à Celldex e a partilha dos custos de desenvolvimento por ambas as empresas (63). Um outro caso consiste na colaboração da Incyte para estudar a combinação do seu anti-IDO epacadostat com o nivolumab (BSM), pembrolizumab (Merck), durvalumab (AstraZeneca) e atezolizumab (Roche) (63). Apesar do estabelecimento destas quatro parcerias, as que são consideradas como as mais promissoras são a da Incyte com a Merck, uma vez que o epacadostat se encontra num EC de fase III com o pembrolizumab para o melanoma metastático e esta combinação irá iniciar em 2017 mais 6 ECs de fase III para outras indicações (67), assim como a da Incyte com a BSM, que irá iniciar, este ano, 2 EC de fase III entre o epacadostat e o nivolumab (68). É de notar que esta situação demonstra a forte competição que se tem verificado entre a BSM e a Merck pela liderança do mercado da imunoterapia para o cancro.

5. Perspetivas Futuras e Conclusão

Como resultado do crescente interesse na imunoterapia combinada para o cancro, são cada vez mais os ECs em que se combinam imunoterapias, sobretudo inibidores do CI, a maioria deles decorrentes de parcerias. Após a realização de uma breve pesquisa em *clinicaltrials.gov* pude verificar que o número de ECs, que se irão iniciar ou que estão a decorrer, de combinações entre inibidores do CI e outras terapêuticas ultrapassa os 1000 ECs (341 combinações com o pembrolizumab, 297 com o nivolumab, 192 com o ipilimumab, 140 com o durvalumab, 110 com o atezolizumab e 36 com o avelumab), pelo que é expectável que nos próximos anos o número de aprovações de imunoterapias combinadas possa aumentar.

Porém, este elevado número de ECs deve ser visto com prudência, uma vez que esta corrida para encontrar as melhores imunoterapias e as melhores combinações, num ambiente cada vez mais competitivo, pode resultar num desenvolvimento clínico demasiado rápido, sem

atender a um desenho racional de ECs e a um suporte pré-clínico adequado, culminando no uso ineficiente de recursos financeiros e humanos (69). Por conseguinte, diversos aspetos devem ser tidos em conta, de modo a que o desenvolvimento de imunoterapias e de combinações seja bem-sucedido, ao invés de contribuir para que este se torne num mercado “bolha”, no qual após um crescimento exponencial se segue um declínio abrupto (69,70).

Num futuro próximo, o desenvolvimento da imunoterapia combinada terá de se focar em diversos pontos críticos para o seu sucesso, nomeadamente no desenvolvimento de estudos pré-clínicos mais adequados que permitam uma melhor compreensão do mecanismo de ação das imunoterapias a combinar, na otimização da dose e da frequência de administração de cada componente da combinação antes de a utilizar em ECs, e na definição de estratégias de gestão da toxicidade das combinações, pois a opção atual passa por interromper a terapêutica ou pela administração de corticosteroides, o que não é o mais desejado. Por outro lado, é cada vez mais fulcral a identificação de biomarcadores preditivos da eficácia e da toxicidade, para além da crescente importância da seleção criteriosa de doentes a incluir em ECs, de acordo com biomarcadores que permitam identificar o grupo de doentes que mais beneficiará de uma dada combinação (70,71).

A imunoterapia combinada é considerada como o futuro da imunoterapia para o cancro e poderá, através de um desenvolvimento racional, vir a demarcar-se das demais terapêuticas, por permitir ultrapassar mecanismos de resistência à imunoterapia e, assim, melhorar a taxa e a qualidade da resposta dos doentes, sendo uma das grandes esperanças para a terapêutica do cancro.

Referências Bibliográficas

- (1) DISIS, M. L. – **Mechanism of action of immunotherapy**. *Seminars in Oncology*. ISSN 0093-7754. 41:5 (2014) S3-S13. doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.09.004.
- (2) D'ERRICO, G. *et al.* – **A current perspective on cancer immune therapy: step-by-step approach to constructing the magic bullet**. *Clinical and Translational Medicine*. ISSN 2001-1326. 6 (2017) 3. doi: 10.1186/s40169-016-0130-5.
- (3) GALLUZI, L. *et al.* – **Classification of current anticancer immunotherapies**. *Oncotarget*. ISSN 1949-2553. 5:24 (2014) 12472-12508. doi: 10.18632/oncotarget.2998.
- (4) CHEN, D. S.; MELLMAN, I. – **Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle**. *Immunity*. ISSN 1074-7613. 39:1 (2013) 1-10. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012.
- (5) MELLMAN, I. *et al.* – **Cancer immunotherapy comes of age**. *Nature*. ISSN 0028-0836. 480:7378 (2011) 480-489. doi: 10.1038/nature10673.
- (6) SMYTH, M. J. – **Multiple approaches to immunotherapy – the new pillar of cancer treatment**. *Immunology and Cell Biology*. ISSN 0818-9641. 95:4 (2017) 323-324. doi: 10.1038/icb.2017.9.
- (7) COLLIN, M. – **Immune checkpoint inhibitors: a patent review (2010-2015)**. *Expert opinion on therapeutic patents*. ISSN 1354-3776. 26:5 (2016) 555-564. doi: 10.1080/13543776.2016.1176150.
- (8) PARDOLL, D. M. – **The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy**. *Nature Reviews Cancer*. ISSN 1474-175X. 12:4 (2012) 252-264. doi: 10.1038/nrc3239.
- (9) PICO DE COAÑA, Y. *et al.* – **Checkpoint blockade for cancer therapy: revitalizing a suppressed immune system**. *Trends in Molecular Medicine*. ISSN 1471-4914. 21:8 (2015) 482-491. doi: 10.1016/j.molmed.2015.05.005.
- (10) SHIN, D. S.; RIBAS, A. – **The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: what's here, what's next?**. *Current Opinion in Immunology*. ISSN 0952-7915. 33 (2015) 23-35. doi: 10.1016/j.coi.2015.01.006.
- (11) BUCHBINDER, E. I.; DESAI, A. – **CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition**. *American Journal of Clinical Oncology*. ISSN 0277-3732. 39:1 (2016) 98-106. doi: 10.1097/COC.000000000000239.

- (12) HODI, F. S. *et al.* – **Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma.** The New England Journal of Medicine. ISSN 0028-4793. 363:8 (2010) 711-723. doi: 10.1056/NEJMoa1003466.
- (13) McDERMOTT, D. F.; ATKINS, M. B. – **PD-1 as a potential target in cancer therapy.** **Cancer Medicine.** ISSN 2045-7634. 2:5 (2013) 662-673. doi: 10.1002/cam4.106.
- (14) RIBAS, A. – **Tumor immunotherapy directed at PD-1.** The New England Journal of Medicine. ISSN 0028-4793. 366:26 (2012) 2517-2519. doi: 10.1056/NEJMe1205943.
- (15) WANG, Q.; WU X. – **Primary and acquired resistance to PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment.** International Immunopharmacology. ISSN 1567-5769. 46 (2017) 210-219. doi: 10.1016/j.intimp.2017.03.015.
- (16) SHARMA, P. *et al.* – **Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy.** Cell. ISSN 0092-8674. 168:4 (2017) 707-723. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.017.
- (17) LU, Y. C.; ROBBINS P. F. – **Cancer immunotherapy targeting neoantigens.** Seminars in Immunology. ISSN 1044-5323. 28:1 (2016) 22-27. doi: 10.1016/j.smim.2015.11.002.
- (18) ŠMAHEL M. – **PD-1/PD-L1 blockade therapy for tumors with downregulated MCH class I expression.** International Journal of Molecular Sciences. ISSN 1422-0067. 18:6 (2017) 1331. doi: 10.3390/ijms18061331.
- (19) BELLONE, M.; ELIA A. R. – **Constitutive and acquired mechanisms of resistance to immune checkpoint blockade in human cancer.** Cytokine Growth Factor Reviews. ISSN 1359-6101. 36 (2017) 17-24. doi: 10.1016/j.cytogfr.2017.06.002.
- (20) RIBAS, A.; HU-LIESKOVAN S. – **What does PD-L1 positive or negative mean?** The Journal of Experimental Medicine. ISSN 0022-1007. 213:13 (2016) 2835-2840. doi: 10.1084/jem.20161462
- (21) HUGO, W. *et al.* – **Genomic and transcriptomic features of response to anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma.** Cell. ISSN 0092-8674. 165:1 (2016) 35-44. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.065.
- (22) LIU Y.; CAO X. – **Immunosuppressive cells in tumor immune escape and metastasis.** Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany). ISSN 0946-2716. 94:5 (2016) 509-522. doi: 10.1007/s00109-015-1376-x.

(23) PLATTEN, M. – **Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion.** *Cancer Research*. ISSN 0008-5472. 72:21 (2012) 5435-5440. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0569.

(24) STAGG, J. *et al.* – **Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. ISSN 0027-8424. 107:4 (2010) 1547-1552. doi: 10.1073/pnas.0908801107.

(25) WHERRY E. J. – **T cell exhaustion.** *Nature Immunology*. ISSN 1529-2908. 12:6 (2011) 492-499. doi: 10.1038/ni.2035.

(26) KELDERMAN, S. – **Acquires and intrinsic resistance in cancer immunotherapy.** *Molecular Oncology*. ISSN 1574-7891. 18:6 (2014) 1132-1139. doi: 10.1016/j.molonc.2014.07.011.

(27) ZARETSKY, J. M. *et al.* – **Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma.** *The New England Journal of Medicine*. ISSN 0028-4793. 375:9 (2016) 819-829. doi: 10.1056/NEJMoal604958.

(28) SWART, M. *et al.* – **Combination approaches with immune-checkpoint blockade in cancer therapy.** *Frontiers in Oncology*. ISSN 2234-943X. 6 (2016) 233. doi: 10.3389/fonc.2016.00233.

(29) OTT, P. A. *et al.* – **Combination immunotherapy: a road map. Journal for immunotherapy of cancer.** ISSN 2051-1426. 5 (2017) 16. doi: 10.1186/s40425-017-0218-5.

(30) VILGELM A. E. *et al.* – **Combinatorial approach to cancer immunotherapy: strength in numbers.** *Journal of Leukocyte Biology*. ISSN 0741-5400. 100:2 (2016) 275-290. doi: 10.1189/jlb.5RI0116-013RR.

(31) GOTWALS, P. *et al.* – **Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy.** *Nature Reviews Cancer*. ISSN 1474-175X. 17:5 (2017) 286-301. doi: 10.1038/nrc.2017.17.

(32) US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov*. [Acedido a 15 de Julho de 2017].

Disponível na Internet:

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT00324155?term=ipilimumab+AND+chemotherapy&rslt=With&type=Intr&rank=7§=X370156>

- (33) US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov*. [Acedido a 15 de Julho de 2017]. Disponível na Internet: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT00324155?term=ipilimumab+AND+chemotherapy&rslt=With&type=Intr&rank=7§=X370156>
- (34) KAUFMAN, H. L. *et al.* – **Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs**. *Nature Reviews Drug Discover.* ISSN: 1474-1776. 14:9 (2015) 642-662. doi: 10.1038/nrd4663.
- (35) FILLEY, A. C.; DEY, M. – **Immune system, friend or foe of oncolytic virotherapy?**. *Frontiers in Oncology.* ISSN 2234-943X. 7:106 (2017). doi: 10.3389/fonc.2017.00106
- (36) PUZANOV, I. *et al.* – **Talimogene laherparepvec in combination with ipilimumab in previously untreated, unresectable stage IIIB-IV melanoma**. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology.* ISSN 0732-183X. 34:22 (2016) 2619-2626. doi: 10.1200/JCO.2016.67.1529.
- (37) MADAN, R. A. *et al.* – **Prostvac-VF: a vector-based vaccine targeting PSA in prostate cancer**. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* ISSN 1354-3784. 18:7 (2009) 1001-1011. doi: 10.1517/13543780902997928.
- (38) SCHOLZ, M. *et al.* – **Phase I clinical trial of sipuleucel-T combined with escalating doses of ipilimumab in progressive metastatic castrate-resistant prostate cancer**. *ImmunoTargets and Therapy.* ISSN 2253-1556. 6 (2017) 11-16. doi: 10.2147/ITT.S122497.
- (39) MELERO, I. *et al.* – **Evolving synergistic combinations of targeted immunotherapies to combat cancer**. *Nature Reviews Cancer.* ISSN 1474-175X. 15:8 (2015) 457-472. doi: 10.1038/nrc3973.
- (40) BAJOR L. D. *et al.* – **Abstract CT137: Combination of agonistic CD40 monoclonal antibody CP-870,893 and anti-CTLA-4 antibody tremelimumab in patients with metastatic melanoma**. *Cancer Research.* ISSN 0008-5472. 75:15 (2015) CT137. doi: 10.1158/1538-7445.AM2015-CT137.
- (41) Department of Neurosurgery, Washington University School of Medicine – **MRI-Guided Neurosurgical Laser Ablation** – 2014. [Acedido a 13 de Agosto de 2017]. Disponível na Internet: <http://www.neurosurgery.wustl.edu/patient-care/technology-innovation/mri-guided-neurosurgical-laser-ablation-136>

- (42) US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov*. [Acedido a 13 de Agosto de 2017]. Disponível na Internet:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02311582?term=Laser+ablation+AND+pembrolizumab&rank=1>
- (43) MARTIN-LIBERAL, J. *et al.* – **The expanding role of immunotherapy**. *Cancer Treatment Reviews*. ISSN 0305-7372. 54 (2017) 74-86. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.01.008.
- (44) DeLUCA, S. L.; GOMMERMAN, J. L. – **Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily**. *Nature Reviews Immunology*. ISSN 1474-1733. 12:5 (2012) 339-351. doi: 10.1038/nri3193.
- (45) INFANTE, R. J. *et al.* – **A phase Ib dose escalation study of the OX40 agonist MOXR0916 and the PD-L1 inhibitor atezolizumab in patients with advanced solid tumors**. *Journal of Clinical Oncology*. ISSN 0732-183X. 34:15 (2016) 101-101. doi: 10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.101.
- (46) SANBORN, E. R. *et al.* – **Clinical results with combination of anti-CD27 agonist antibody, varlilumab, with anti-PD1 antibody nivolumab in advanced cancer patients**. *Journal of Clinical Oncology*. ISSN 0732-183X. 35:15 (2017) 3007-3007. doi: DOI: 10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.3007.
- (47) OELKRUG, C.; RAMAGE J. M. – **Enhancement of T cell recruitment and infiltration into tumours**. *Clinical and Experimental Immunology*. ISSN 0009-9104. 178:1 (2014) 1-8. doi: 10.1111/cei.12382.
- (48) VORON, T. *et al.* – **VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8⁺ T cells in tumors**. *The Journal of Experimental Medicine*. ISSN 0022-1007. 212:2 (2015) 139-148. doi: 10.1084/jem.20140559.
- (49) McDERMOTT, F. D. *et al.* – **A phase II study of atezolizumab (atezo) with or without bevacizumab (bev) versus sunitinib (sun) in untreated metastatic renal cell carcinoma (mRCC) patients (pts)**. *Journal of Clinical Oncology*. ISSN 0732-183X. 35:6 (2017) 431-431. doi: 10.1200/JCO.2017.35.6_suppl.431.
- (50) KHALIL, D. N. *et al.* – **The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy**. *Nature Reviews Clinical Oncology*. ISSN 1759-4774. 13:5 (2016) 273-290. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.25.

(51) Bristol-Myers Squibb, Press Release – **Anti-LAG-3 (BMS-986016) in Combination with Opdivo (nivolumab) Showed Activity in Patients with Melanoma Who Were Relapsed or Refractory to Anti-PD-1/PD-L1 Therapy** – 2017. [Acedido a 15 de Agosto de 2017]. Disponível na Internet: <https://investors.bms.com/iframes/press-releases/press-release-details/2017/Anti-LAG-3-BMS-986016-in-Combination-with-Opdivo-nivolumab-Showed-Activity-in-Patients-with-Melanoma-Who-Were-Relapsed-or-Refractory-to-Anti-PD-1-PD-L1-Therapy/default.aspx>

(52) LARKIN, J. *et al.* - **Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma**. The New England Journal of Medicine. ISSN 0028-4793. 373:1 (2015) 23-34. doi: 10.1056/NEJMoal504030.

(53) Bristol-Myers Squibb, Press Release – **Bristol-Myers Squibb Receives Approval from the U.S. Food and Drug Administration for the Opdivo (nivolumab) + Yervoy (ipilimumab) Regimen in BRAF V600 Wild-Type Unresectable or Metastatic Melanoma** – 2015. [Acedido a 07 de Julho de 2017]. Disponível na Internet: <https://news.bms.com/press-release/bristol-myers-squibb-receives-approval-us-food-and-drug-administration-opdivo-nivoluma>

(54) Bristol-Myers Squibb, Press Release – **European Commission Approves the First and Only Immuno-Oncology Combination, Bristol-Myers Squibb’s Opdivo® (nivolumab) + Yervoy® (ipilimumab) Regimen, for Treatment of Advanced Melanoma** – 2016. [Acedido a 07 de Julho de 2017]. Disponível na Internet: <https://news.bms.com/press-release/cancer/european-commission-approves-first-and-only-immuno-oncology-combination-bristol>

(55) Merck, Press Release - **FDA Approves Merck’s KEYTRUDA® (pembrolizumab) as First-Line Combination Therapy with Pemetrexed and Carboplatin for Patients with Metastatic Nonsquamous Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC), Irrespective of PD-L1 Expression** – 2017. [Acedido a 09 de Julho de 2017]. Disponível na Internet: <http://investors.merck.com/news/press-release-details/2017/FDA-Approves-Mercks-KEYTRUDA-pembrolizumab-as-First-Line-Combination-Therapy-with-Pemetrexed-and-Carboplatin-for-Patients-with-Metastatic-Nonsquamous-Non-Small-Cell-Lung-Cancer-NSCLC-Irrespective-of-PD-L1-Expression/default.aspx>

(56) National Cancer Institute, News & Events - **FDA Expands Approval of Pembrolizumab for First-Line Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer** – 2017.

[Acedido a 16 de Agosto de 2017]. Disponível na Internet: <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2017/fda-pembrolizumab-lung-expanded>

(57) ROBERT, C. *et al.* - **Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma**. The New England Journal of Medicine. ISSN 0028-4793. 372:26 (2015) 2521-2532. doi: 10.1056/NEJMoa1503093.

(58) YEARLEY, J. H. *et al.* - **PD-L2 Expression in Human Tumors: Relevance to Anti-PD-1 Therapy in Cancer**. Clinical Cancer Research. ISSN 1078-0432. 23:12 (2017) 3158-3167. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1761.

(59) KIM, J. M.; CHEN, D. S. - **Immune escape to PD-L1/PD-1 blockade: seven steps to success (or failure)**. Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology. ISSN 0923-7534. 27:8 (2016) 1492-1504. doi: 10.1093/annonc/mdw217.

(60) TOPALIAN, S. L. *et al.* - **Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy**. Nature Reviews Cancer. ISSN 1474-175X. 16:5 (2016) 275-287. doi: 10.1038/nrc.2016.36.

(61) TENG, M. W. L. *et al.* - **Classifying cancers based on T cell infiltration and PD-L1**. Cancer Research. ISSN 0008-5472. 75:11 (2015) 2139-2145. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0255.

(62) BLANK, C. U. *et al.* - **The “cancer immunogram”**. Science (New York, N.Y.). ISSN 0036-8075. 352:6286 (2016) 658-660. doi: 10.1126/science.aaf2834.

(63) TALREJA, C. *et al.* - **Immuno-oncology combinations: a Thomson Reuters report. Drugs of the Future**. ISSN 0377-8282. 39 (2014) 793-798. doi: 10.1358/dof.2014.39.11.2257345.

(64) LESUEUR, O.; LAING, R.; RATNER, M. - **Immunotherapy: Big Pharma’s Seductive Embrace**. In Vivo: The Business & Medicine Report. 2014. [Acedido a 21 de Julho de 2017]. Disponível na Internet: http://bionest.com/wp-content/uploads/2015/10/Immunotherapy_IVI412_Bionest.pdf

(65) Tufts Center for Drug Development - **Promise of immuno-oncology therapies is boosting R&D funding and alliances**. Impact Report (March-April, 2016). [Acedido a 10 de Julho de 2017]. Disponível na Internet: http://csdd.tufts.edu/news/complete_story/pr_ir_mar_apr_2016

- (66) LEGENDRE, A.; HENDRY, F. – **Immunotherapies in oncology: the future of cancer treatment lies in combinations and partnerships**. DeepDive: Oncology, Digital Magazine (May, 2017). [Acedido a 29 de Julho de 2017]. Disponível na Internet: <http://deep-dive.pharmaphorum.com/deep-dive-oncology-may-2017#!/immunotherapies-in-oncology>
- (67) Incyte, Press Release - **Bristol-Myers Squibb and Incyte to Advance the Combination of Opdivo (nivolumab) and Epacadostat into First-line Registrational Trials** – 2017. [Acedido a 18 de Agosto de 2017]. Disponível na Internet: http://phx.corporate-ir.net/phoenix.zhtml?c=69764&p=irol-newsArticle_print&ID=2259063
- (68) Incyte, Press Release - **Incyte and Merck Provide Additional Details on Previously Announced Collaboration Investigating Epacadostat and KEYTRUDA® (pembrolizumab)** – 2017. [Acedido a 18 de Agosto de 2017]. Disponível na Internet: http://phx.corporate-ir.net/phoenix.zhtml?c=69764&p=irol-newsArticle_Print&ID=2257855
- (69) The Lancet Oncology - **Calling time on the immunotherapy gold rush**. The Lancet Oncology. ISSN 1470-2045. 18:8 (2017) 981. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30521-1.
- (70) American Society of Clinical Oncology (ASCO), Daily News - **Complexities of Immunotherapy Highlighted at New Drugs Seminar** – 2016. [Acedido a 20 de Agosto de 2017]. Disponível na Internet: <https://am.asco.org/complexities-immunotherapy-highlighted-new-drugs-seminar>
- (71) MORRISSEY, K. M. *et al.* - **Immunotherapy and novel combinations in oncology: current landscape, challenges, and opportunities**. Clinical and Translational Science. ISSN 1752-8054. 9:2 (2016) 89-104. doi: 10.1111/cts.12391.

Anexos (Tabela 1 e Tabela 3)

Tabela 1. Imunoterapias e combinações aprovadas para o cancro, pela FDA e pela EMA, desde a ascensão da imunoterapia

Fármaco	Mecanismo de Ação	FDA		EMA		Empresa
		Indicação	Ano	Indicação	Ano	
Sipuleucel-T (Provenge®)	Vacina de Células Dendríticas	Cancro da Próstata	2010	—————	———	Dendreon
Ipilimumab (Yervoy®)	Anti-CTLA-4	Melanoma	2011	Melanoma	2011	Bristol-Myers Squibb
Nivolumab (Opdivo®)	Anti-PD-I	Melanoma	2014	Melanoma	2015	Bristol-Myers Squibb
		NSCLC	2015	NSCLC	2015	
		RCC	2015	RCC	2016	
		Linfoma de Hodgkin	2016	Linfoma de Hodgkin	2016	
		HNSCC	2016	HNSCC	2017	
		Carcinoma Urotelial	2017	Carcinoma Urotelial	2017	
		Cancro Colo-retal	2017	—————	———	
Pembrolizumab (Keytruda®)	Anti-PD-I	Melanoma	2014	Melanoma	2015	Merck Sharp & Dohme
		NSCLC	2015	NSCLC	2016	
		HNSCC	2016	Linfoma de Hodgkin	2017	
		Linfoma de Hodgkin	2017	Carcinoma Urotelial	2017	
		Carcinoma Urotelial	2017	—————	———	

Atezolizumab (Tecentriq®)	Anti-PD-L1	Carcinoma Urotelial	2016	_____	_____	Genentech (Grupo Roche)
		NSCLC	2016	_____	_____	
Durvalumab (Imfinzi®)	Anti-PD-L1	Carcinoma Urotelial	2017	_____	_____	AstraZeneca
Avelumab (Bavencio®)	Anti-PD-L1	Carcinoma de Células de Merkel	2017	_____	_____	Pfizer
		Carcinoma Urotelial	2017	_____	_____	
Ipilimumab + Nivolumab (Yervoy® + Opdivo®)	Anti-CTLA-4 + Anti-PD-I	Melanoma	2015	Melanoma	2016	Bristol-Myers Squibb
Pembrolizumab (Keytruda®) + Pemetrexed e Carboplatina	Anti-PD-I + Quimioterapia	NSCLC	2017	_____	_____	Merck Sharp & Dohme
Talimogene Laherparepvec (T-VEC) (Imlygic®)	Vírus Oncolítico	Melanoma	2015	Melanoma	2015	Amgen
Tisagenlecleucel (Kymriah®)	ACT - Linfócitos T com CAR anti-CD19	Leucemia Linfoblástica Aguda de Linfócitos B	2017	_____	_____	Novartis

Abreviaturas: ACT – *Adoptive Cell Therapy* / Terapia Celular Adaptativa; CAR - *Chimeric Antigen Receptor*; CTLA-4 - *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*; HNSCC – Carcinoma das Células Escamosas da Cabeça e Pescoço; NSCLC – Carcinoma Pulmonar de Não Pequenas Células; PD-I - *Programmed Death I*; PD-L1 - *Programmed Death Ligand I*; RCC – Carcinoma das Células Renais

Tabela 3. Pequena seleção dos ensaios clínicos em execução de combinações com inibidores do *checkpoint* imunitário

Racional	Inibidor do CI		Combinação		Tipo do Tumor	Fase	Referência
Aumento da liberação de antigénios tumorais	Ipilimumab	Anti-CTLA-4	Quimioterapia		Melanoma	II	NCT01676649
	Nivolumab	Anti-PD-I	Quimioterapia		NSCLC	I/II	NCT02574078
	Nivolumab	Anti-PD-I	Quimioterapia		Tumores Sólidos	I/II	NCT02423954
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Quimioterapia		Cancro Colo-retal	II	NCT02260440
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Quimioterapia		Carcinoma Esofágico	III	NCT03189719
	Atezolizumab	Anti-PD-LI	Quimioterapia		Carcinoma Urotelial	III	NCT02807636
	Durvalumab	Anti-PD-LI	Quimioterapia		Adenocarcinoma Pancreático	I/II	NCT02583477
	Avelumab	Anti-PD-LI	Quimioterapia		Cancro do Ovário	III	NCT02718417
	Ipilimumab	Anti-CTLA-4	Radioterapia		Melanoma com Metástases Cerebrais	II	NCT02107755
	Nivolumab	Anti-PD-I	Radioterapia		RCC	II	NCT02962804
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Radioterapia		HNSCC	II	NCT03085719
	Durvalumab	Anti-PD-LI	Radioterapia		Cancro do Pâncreas	II	NCT02885727
	Avelumab	Anti-PD-LI	Radioterapia		NSCLC	I/II	NCT03050554
	Ipilimumab	Anti-CTLA-4	Vírus Oncolíticos	T-VEC (Imlygic®)	Melanoma	I/II	NCT01740297
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Vírus Oncolíticos	T-VEC (Imlygic®)	Melanoma	I/III	NCT02263508

	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Vírus Oncolíticos	T-VEC (Imlygic®)	Sarcoma	II	NCT03069378
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Vírus Oncolíticos	T-VEC (Imlygic®)	HNSCC	I	NCT02626000
	Nivolumab	Anti-PD-I	Vírus Oncolíticos	Enadenotucirev	HNSCC, Carcinoma da Bexiga, Cancro Colo-retal e das Glândulas Salivares	I	NCT02636036
	Ipilimumab	Anti-CTLA-4	Vírus Oncolíticos	Pexa-Vec	Tumores Sólidos	I	NCT02977156
	Ipilimumab	Anti-CTLA-4	Vírus Oncolíticos	Cavatak®	Melanoma	I	NCT02307149
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Vírus Oncolíticos	Cavatak®	NSCLC e Cancro da Bexiga	I	NCT02043665
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Vírus Oncolíticos	Cavatak®	Melanoma	I	NCT02565992
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Vírus Oncolíticos	Reolysin®	Adenocarcinoma Pancreático	I	NCT02620423
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Vírus Oncolíticos	DNX-2401	Glioblastoma	II	NCT02798406
	Ipilimumab	Anti-CTLA-4	Vírus Oncolíticos	HF10	Melanoma	II	NCT02272855
Estimulação da apresentação de antígenos tumorais	Ipilimumab	Anti-CTLA-4	Vacinas Peptídicas	6MHP	Melanoma	I/II	NCT02385669
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Vacinas Peptídicas	6MHP	Melanoma	I/II	NCT02515227
	Ipilimumab	Anti-CTLA-4	Vacinas Peptídicas	NeoVax	Cancro do Fígado	I	NCT02950766
	Ipilimumab	Anti-CTLA-4	Vacinas de Vírus Atenuados	Prostvac	Cancro da Próstata	II	NCT02506114
	Nivolumab e/ou Ipilimumab	Anti-PD-I Anti-CTLA-4	Vacinas de Vírus Atenuados	Prostvac	Cancro da Próstata	I/II	NCT02933255

	Nivolumab	Anti-PD-I	Vacinas de Células Tumorais	GVAX	Cancro do Pâncreas	I/II	NCT02451982
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Vacinas de Células Tumorais	GVAX	Cancro Colo-retal	II	NCT02981524
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Vacinas de Células Tumorais	Vigil®	Melanoma	I	NCT02574533
	Atezolizumab	Anti-PD-L1	Vacinas de Células Tumorais	Vigil®	Cancros Ginecológicos Avançados	II	NCT03073525
	Ipilimumab	Anti-CTLA-4	Vacinas de Células Dendríticas	Sipuleucel-T (Provenge®)	Cancro da Próstata	II	NCT01804465
	Atezolizumab	Anti-PD-L1	Vacinas de Células Dendríticas	Sipuleucel-T (Provenge®)	Cancro da Próstata	I	NCT03024216
	Nivolumab	Anti-PD-I	Vacinas de Células Dendríticas	DCVax-L	Glioblastoma	II	NCT03014804
	Nivolumab	Anti-PD-I	Agonista do CD40	APX005M	Melanoma e NSCLC	I/II	NCT03123783
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Agonista do CD40	APX005M	Melanoma	I/II	NCT02706353
	Atezolizumab	Anti-PD-L1	Agonista do CD40	RO7009789	Tumores Sólidos	I	NCT02304393
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Ablação por Laser		Glioblastoma	I/II	NCT02311582
Promoção da ativação de linfócitos T	Nivolumab	Anti-PD-I	Anti-CTLA-4	Ipilimumab	Tumores Gastrointestinal, Neuroendócrino e Ginecológico Raros	II	NCT02923934
	Nivolumab	Anti-PD-I	Anti-CTLA-4	Ipilimumab	NSCLC	III	NCT03048136
	Nivolumab	Anti-PD-I	Anti-CTLA-4	Ipilimumab	RCC	III	NCT02231749

Nivolumab	Anti-PD-I	Anti-CTLA-4	Ipilimumab	Mesotelioma Pleural	III	NCT02899299
Nivolumab	Anti-PD-I	Anti-CTLA-4	Ipilimumab	Carcinoma Urotelial	III	NCT03036098
Nivolumab	Anti-PD-I	Anti-CTLA-4	Ipilimumab	Melanoma	II	NCT02731729
Nivolumab	Anti-PD-I	Anti-CTLA-4	Ipilimumab	Glioblastoma	I	NCT03233152
Durvalumab	Anti-PD-LI	Anti-CTLA-4	Tremelimumab	Mesotelioma Pleural	II	NCT03075527
Durvalumab	Anti-PD-LI	Anti-CTLA-4	Tremelimumab	Cancro da Próstata	II	NCT02788773
Durvalumab	Anti-PD-LI	Anti-CTLA-4	Tremelimumab	NSCLC	III	NCT02542293
Durvalumab	Anti-PD-LI	Anti-CTLA-4	Tremelimumab	HNSCC	III	NCT02551159
Nivolumab e/ou Ipilimumab	Anti-PD-I Anti-CTLA-4	Agonista do OX40	INCAGN01949	Tumores Metastáticos ou Avançados	I/II	NCT03241173
Atezolizumab	Anti-PD-LI	Agonista do OX40	MOXR0916	Tumores Sólidos	I	NCT02410512
Pembrolizumab	Anti-PD-I	Agonista do OX40	GSK3174998	Tumores Sólidos	I	NCT02528357
Nivolumab	Anti-PD-I	Agonista do CD27	Varlilumab	Tumores Sólidos	I/II	NCT02335918
Nivolumab	Anti-PD-I	Agonista do CDI37	Urelumab	Glioblastoma	I	NCT02658981
Nivolumab e/ou Ipilimumab	Anti-PD-I Anti-CTLA-4	Agonista do G1TR	INCAGN01876	Tumores Metastáticos ou Avançados	I/II	NCT03126110
Pembrolizumab	Anti-PD-I	Agonista do G1TR	MK-1248	Tumores Sólidos	I	NCT02553499
Nivolumab	Anti-PD-I	Agonista do ICOS	JTX-2011	Tumores Sólidos	I/II	NCT02904226
Pembrolizumab	Anti-PD-I	Agonista do ICOS	GSK3359609	Tumores Sólidos	I	NCT02723955

Estimulação da migração de linfócitos T e inibição da migração de MDSCs e linfócitos Treg	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Anti-CXCR1/2	SX-682	Melanoma	I	NCT03161431
	Nivolumab	Anti-PD-I	Anti-CCR4	Mogamulizumab	Tumores Sólidos	I/II	NCT02705105
	Durvalumab	Anti-PD-L1	Anti-CCR4	Mogamulizumab	Tumores Sólidos	I	NCT02301130
	Tremelimumab	Anti-CTLA-4	Anti-CCR4	Mogamulizumab	Tumores Sólidos	I	NCT02301130
	Durvalumab	Anti-PD-L1	Anti-CXCR4	LY2510924	Tumores Sólidos	I	NCT02737072
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Anti-CXCR4	BL-8040	Adenocarcinoma Pancreático	II	NCT02826486
	Atezolizumab	Anti-PD-L1	Anti-CXCR4	BL-8040	Leucemia Mielóide Aguda	I/II	NCT03154827
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Anti-CXCL12	Olaptesed pegol	Cancros Colo-retal e Pancreático	I/II	NCT03168139
Promoção da infiltração tumoral	Ipilimumab	Anti-CTLA-4	Anti-VEGF	Bevacizumab	Melanoma	II	NCT01950390
	Nivolumab	Anti-PD-I	Anti-VEGF	Bevacizumab	RCC	I	NCT02210117
	Nivolumab	Anti-PD-I	Anti-VEGF	Bevacizumab	Cancro do Ovário, das Trompas de Falópio e Peritoneal	II	NCT02873962
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Anti-VEGF	Bevacizumab	RCC	I/II	NCT02348008
	Atezolizumab	Anti-PD-L1	Anti-VEGF	Bevacizumab	Tumores Sólidos Raros	II	NCT03074513
	Atezolizumab	Anti-PD-L1	Anti-VEGF	Bevacizumab	RCC	III	NCT02420821

	Atezolizumab	Anti-PD-L1	Anti-VEGF	Bevacizumab	Carcinoma Urotelial	II	NCT03133390
	Durvalumab	Anti-PD-L1	Anti-VEGFR-2	Ramucirumab	Tumores Gastrointestinais ou Torácicos Avançados	I	NCT02572687
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Anti-VEGFR-2	Ramucirumab	Tumores Gástrico, Gastroesofágico, Urotelial, do Trato Biliar e NSCLC	I	NCT02443324
	Nivolumab	Anti-PD-I	Anti-VEGFR-2	Ramucirumab	Cancro Gástrico e Gastroesofágico	I/II	NCT02999295
Aumento do reconhecimento de antígenos tumorais pelos linfócitos T	Pembrolizumab	Anti-PD-I	ACT – Linfócitos T de Infiltração Tumoral		Melanoma	II	NCT02621021
	Nivolumab	Anti-PD-I	ACT – Linfócitos T de Infiltração Tumoral		NSCLC	I	NCT03215810
	Nivolumab	Anti-PD-I	ACT – Linfócitos T de Infiltração Tumoral		Melanoma e Cancro do Ovário Metastáticos	I	NCT03158935
	Ipilimumab	Anti-CTLA-4	ACT - Linfócitos T Modificados		Melanoma	II	NCT02027935
	Ipilimumab	Anti-CTLA-4	ACT - Linfócitos T Modificados + Vacina de Células Dendríticas		Tumores Sólidos	I	NCT02070406
	Avelumab	Anti-PD-L1	ACT - Linfócitos T Modificados		Carcinoma de Células de Merkel	I/II	NCT02584829
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	ACT - Linfócitos T Modificados		Cancro Gastrointestinal	I	NCT02757391
	Atezolizumab	Anti-PD-L1	ACT – Linfócitos T com o CAR anti-CD19 (KTE-C19)		Linfoma Difuso de Grandes Células B	I/II	NCT02926833

Promoção da morte das células tumorais mediada pelos linfócitos T	Nivolumab	Anti-PD-I	Anti-LAG-3	BMS-986016	Tumores Sólidos	I	NCT02966548
	Nivolumab	Anti-PD-I	Anti-LAG-3	BMS-986016	RCC	II	NCT02996110
	Nivolumab	Anti-PD-I	Anti-LAG-3	BMS-986016	Glioblastoma	I	NCT02658981
	Nivolumab	Anti-PD-I	Anti-LAG-3	BMS-986016	Cancro Gástrico	II	NCT02935634
	Nivolumab	Anti-PD-I	Anti-TGFβRI	Galunisertib	Tumores Sólidos Avançados, NSCLC e Cancro Hepatocelular	I/II	NCT02423343
	Durvalumab	Anti-PD-LI	Anti-TGFβRI	Galunisertib	Cancro Pancreático	I	NCT02734160
	Durvalumab	Anti-PD-LI	Anti-CD73	MEDI9447	Tumores Sólidos	I	NCT02503774
	Atezolizumab	Anti-PD-LI	Anti-A2aR	CPI-444	Tumores Sólidos	I	NCT02655822
	Ipilimumab	Anti-CTLA-4	Anti-IDO	Indoximod	Melanoma	I/II	NCT02073123
	Nivolumab	Anti-PD-I	Anti-IDO	Indoximod	Melanoma	I/II	NCT02073123
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Anti-IDO	Indoximod	Melanoma	I/II	NCT02073123
	Nivolumab	Anti-PD-I	Anti-IDO	Epacadostat	Múltiplos Tipos de Cancro	I/II	NCT02327078
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Anti-IDO	Epacadostat	Melanoma	III	NCT02752074
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Anti-IDO	Epacadostat	HNSCC	II	NCT03238638
	Pembrolizumab	Anti-PD-I	Anti-IDO	Epacadostat	Cancro Gástrico e Gastroesofágico	II	NCT03196232
	Atezolizumab	Anti-PD-LI	Anti-IDO	Epacadostat	NSCLC e Carcinoma Urotelial	I	NCT02298153
	Durvalumab	Anti-PD-LI	Anti-IDO	Epacadostat	Múltiplos Tipos de Cancro	I/II	NCT02318277

	Atezolizumab	Anti-PD-L1	Anti-IDO	GDC-0919	Tumores Sólidos	I	NCT02471846
--	--------------	------------	----------	----------	-----------------	---	-------------

Abreviaturas: HNSCC – Carcinoma das Células Escamosas da Cabeça e Pescoço; Linfócitos Treg – Linfócitos T reguladores; MDSCs - *Myeloid-Derived Suppressor Cells*/Células Supressoras Derivadas da Linhagem Mieloide; NSCLC – Carcinoma Pulmonar de Não Pequenas Células; RCC – Carcinoma das Células Renais

Joana Maria da Silva Fiteiro

Parte II

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Relatório de Estágio realizado no âmbito da Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação do Dr. Rui Aguiar Pinto,
apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Abreviaturas

API – *Active Pharmaceutical Ingredient* / Princípio ativo

cGMP – *Current Good Manufacturing Practices*

CQ – Controle de Qualidade

CTD – *Common Technical Document*

DA – Desenvolvimento Analítico

DAG – Desenvolvimento Analítico e Galénico

DG – Desenvolvimento Galénico

DMF – *Drug Master File*

GC – Cromatografia Gasosa

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ID – Investigação e Desenvolvimento

IF – Indústria Farmacêutica

LC-MS - Cromatografia Líquida Acoplada por Espectrometria de Massa

ME – Medicamentos Experimentais

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

OoS – *Out-of-Specification* / Fora da Especificação

OoT – *Out-of-Trend* / Fora da Tendência

PSA – Produto Semiacabado

SWOT - *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats* / Forças, Fraquezas, Oportunidades e Ameaças

ToF-SIMS - *Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry*

Introdução

O estágio corresponde à unidade curricular final que compõe o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) e é uma etapa fulcral no percurso académico, ao proporcionar um primeiro contacto com a prática profissional antes da entrada no mercado de trabalho, o que permite o conhecimento e a experiência do quotidiano de uma área de atividade da profissão farmacêutica. Trata-se, sem dúvida, de uma mais-valia, pois através da vivência de desafios e situações que surgem somente na prática profissional, o estágio permite não só a consolidação de conhecimentos teóricos e práticos adquiridos no decorrer do curso e a sua aplicação em contexto real, como também o desenvolvimento de competências, habilitando o estudante a uma melhor preparação para a posterior entrada no mercado de trabalho.

De modo a enriquecer a minha formação, optei pela realização de um estágio em Indústria Farmacêutica (IF), adicionalmente ao de Farmácia Comunitária. Esta opção resultou do facto de diversas unidades curriculares do MICF terem abordado o papel do farmacêutico na indústria, o que me suscitou curiosidade e gosto em aprofundar os meus conhecimentos sobre esta área profissional. Foi-me despoletado um particular interesse em conhecer as atividades de desenvolvimento de produtos farmacêuticos, realizadas a montante da produção industrial. Propus-me, assim, a realizar um estágio curricular na Bluepharma, Indústria Farmacêutica, S.A, no departamento do Desenvolvimento Analítico e Galénico (DAG), que decorreu no período entre 9 de Janeiro de 2017 e 7 de Abril de 2017, sob a orientação do Dr. Rui Aguiar Pinto.

A Bluepharma é uma empresa farmacêutica nascida em 2001, na sequência da aquisição duma unidade industrial pertencente à multinacional Bayer, por um grupo de profissionais ligados ao setor farmacêutico, encontrando-se sediada em São Martinho do Bispo, Coimbra (1). Atualmente, a empresa dedica-se ao fabrico de medicamentos próprios e para terceiros, à investigação, ao desenvolvimento e à comercialização de medicamentos genéricos, percorrendo, assim, toda a cadeia de valor do medicamento desde a ID até ao mercado (1,2).

Dado que a visão da empresa é investir para inovar e inovar para internacionalizar (4), o desenvolvimento de novos medicamentos genéricos é uma das suas premissas e, como tal, o DAG é um dos departamentos que a constitui. Este encontra-se subdividido em três setores, os Desenvolvimentos Galénico (DG) e Analítico (DA) e as Estabilidades, e tem como principais atividades o desenvolvimento de formulações farmacêuticas, o desenvolvimento e validação de métodos analíticos, a execução de estudos de transposição de escala e de estabilidade, e a produção e embalamento de medicamentos experimentais para uso humano (5). No estágio estive inserida no setor do DA e centrei-me, sobretudo, na revalidação de métodos analíticos.

Análise SWOT Fundamentada

O presente relatório pauta-se por uma avaliação crítica do estágio e da minha prestação, onde estão expostas as atividades que realizei e os conhecimentos e competências que adquiri ou que aprofundei no decorrer do estágio. Para tal, procedi a uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*) fundamentada, que conta com uma análise interna dos pontos fortes e fracos que marcaram o estágio e a minha prestação, bem como com uma análise externa daquilo que considero como oportunidades que o estágio me conferiu e que contribuíram para o meu enriquecimento profissional e, ainda, dos aspetos que possam ter ameaçado o meu desempenho. Assim, esta análise visa orientar a minha reflexão sobre o que vivenciei durante os 3 meses de estágio e qual o seu impacto na minha formação.

No esquema abaixo encontra-se representado um esquema da análise SWOT realizada e que irei, de seguida, fundamentar.

Tabela I – Análise SWOT em esquema

	Pontos Fortes	Pontos Fracos
Análise Interna	<ul style="list-style-type: none">• Plano individual de integração• Forte componente formativa• Aquisição de conhecimentos sobre validação, implementação e revalidação de métodos analíticos• Atividades no âmbito da revalidação de métodos<ul style="list-style-type: none">- Monitorização dos métodos analíticos a revalidar- Elaboração de <i>drafts</i> de relatórios de decisão• Interação com outros setores• Promoção do sentido crítico• Ganho de autonomia	<ul style="list-style-type: none">• Componente laboratorial• Duração do estágio
	Oportunidades	Ameaças
Análise Externa	<ul style="list-style-type: none">• Conhecimento do funcionamento do desenvolvimento analítico• Contacto com a tecnologia dos filmes orais• Participação no embalamento e expedição de medicamentos experimentais• Integração de conhecimentos adquiridos no MICF• Aumento dos conhecimentos em Excel	<ul style="list-style-type: none">• Referência ao papel do farmacêutico no desenvolvimento analítico durante o MICF

I. Análise Interna - Pontos Fortes

I.1. Plano Individual de Integração

O cumprimento de um plano individual de integração, na primeira semana de estágio, foi essencial para o meu enquadramento na realidade da IF. Este plano consistiu, primeiramente, numa visita a todos os departamentos e setores da empresa, onde os colaboradores puderam conhecer os novos membros e onde pude perceber qual a importância e a responsabilidade de cada setor no seio da empresa e quais as principais atividades realizadas em cada um deles. O plano compreendeu, ainda, a realização de diversas formações sobre conceitos fulcrais para a minha envolvência no quotidiano da empresa, entre os quais a sua evolução histórica, a utilização do seu sistema informático, o sistema de gestão integrado, o sistema de gestão documental e de gestão de processos e noções básicas de assuntos regulamentares e de farmacovigilância. Todas estas formações teóricas visaram a compreensão do funcionamento da IF e desta empresa em particular, o que contribuiu para a minha fácil integração.

I.2. Forte Componente Formativa

O estágio primou por uma forte oferta formativa, quer nas primeiras semanas através do plano de integração, quer ao longo do estágio, o que me permitiu participar em diversas formações, a maioria delas com grande aplicabilidade para as atividades que realizei. Destas destaco as formações relativas às *current Good Manufacturing Practices* (cGMP), ao desenvolvimento de medicamentos, à expedição, devolução e destruição de medicamentos experimentais (ME) e procedimentos laboratoriais. É de realçar, ainda, as diversas explicações e partilhas em que pude escutar e aprender com a experiência e o saber dos profissionais, enaltecendo a disponibilidade, a recetividade e a simpatia que sempre me manifestaram.

I.3. Aquisição de Conhecimentos sobre Validação, Implementação e Revalidação de Métodos Analíticos

O estudo dos processos de validação, implementação e revalidação de métodos analíticos foi impreterível para a realização das principais tarefas que me foram propostas neste estágio. Apesar da noção de validação analítica não me ser desconhecida, já que foi abordada numa unidade curricular do MICEF, no início do estágio pude estudar este processo com maior detalhe e adquirir novos conhecimentos relativos a este tema, assim como aos conceitos de implementação e revalidação de métodos analíticos. Ademais, com o intuito de complementar o estudo teórico destes processos, acompanhei a execução laboratorial de parte da validação analítica de um método de conteúdo por HPLC, nomeadamente a avaliação da linearidade.

Como resultado dos conhecimentos que adquiri, encontra-se, a seguir, uma breve exposição acerca destes processos analíticos:

A validação analítica é o processo através do qual se demonstra que as características de desempenho de um método analítico cumprem os requisitos pré-determinados para a finalidade a que se destina e, por conseguinte, que o método analítico é adequado e permite obter resultados consistentes, fiáveis, seguros e com exatidão. Assim, numa validação analítica, são avaliadas as características de desempenho do método, nomeadamente a exatidão, a especificidade, os limites de deteção e de quantificação, a linearidade, o *range* (intervalo entre a menor e a maior concentrações de analito na amostra para o qual o método tem exatidão, precisão e linearidade adequadas), a robustez e a precisão do método (repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade). O processo de validação analítica aplica-se tanto a métodos qualitativos, como a quantitativos, destacando-se os métodos cromatográficos (HPLC e GC), os espectrofotométricos e os potenciométricos, aos quais se recorre para avaliar conteúdos, substâncias relacionadas, testes de identificação, dissoluções, entre outros testes adicionais.

Os testes de validação analítica variam em função do método a validar e do grau de robustez do método. Os novos métodos analíticos desenvolvidos pelo DA serão validados com todos os testes necessários a garantir a adequabilidade do método. Por outro lado, métodos previamente desenvolvidos noutra laboratório, descritos no CTD ou no DMF, ou métodos descritos em monografias de farmacopeias serão sujeitos a um programa de validação mais curto, no qual são avaliadas apenas algumas características de desempenho, num processo que se designa de implementação de metodologia analítica.

No que respeita à revalidação de métodos analíticos, trata-se do processo mediante o qual se assegura que o método se mantém adequado para o seu propósito analítico, após ter sido introduzida uma alteração. No entanto, uma revalidação apenas é requerida quando se procede a uma alteração que seja crítica, isto é, quando se trate de uma alteração no método ou no produto e quando a alteração esteja fora do âmbito do método. A extensão da revalidação é definida tendo em conta a alteração introduzida num dado método previamente validado ou implementado, pelo que é avaliada caso a caso.

É de notar que uma revalidação analítica pode ser realizada por três motivos: 1) a pedido de autoridades ou de clientes; 2) devido a uma alteração crítica no método; 3) por decisão interna, após a avaliação periódica da *performance* do método analítico, no sentido da melhoria contínua. Neste último caso, por decisão interna, pode proceder-se à revalidação de um método analítico quando se verifica um mau desempenho do método, uma tendência nos

resultados analíticos devida exclusivamente ao método, ou quando se adapta o método às novas tecnologias disponíveis. Por conseguinte, segundo a norma interna da empresa, periodicamente, no máximo a cada 5 anos, deve proceder-se a uma avaliação da *performance* do método analítico, de modo a determinar se o método requer ou não uma alteração e, conseqüentemente, uma revalidação, com o objetivo final de melhoria contínua.

1.4. Atividades no Âmbito da Revalidação de Métodos Analíticos

Após compreender os conceitos de validação, implementação e revalidação de métodos, integrei e apliquei os conhecimentos adquiridos, ao executar tarefas referentes à revalidação de métodos analíticos por decisão interna, tendo sido estas as principais atividades que marcaram o meu estágio.

1.4.1. Monitorização dos Métodos Analíticos com Necessidade de Revalidação

O estágio incidiu, sobretudo, na monitorização dos métodos analíticos com necessidade de revalidação, para cada princípio ativo (API) ou produto semiacabado (PSA). Esta monitorização implicou uma sistematização, sob a forma de uma lista, para cada API ou PSA, de todos os métodos analíticos validados ou implementados pela empresa, assim como de dados dos seus relatórios de validação ou implementação mais recentes e da data limite em que se deverá proceder à avaliação da *performance* analítica de cada um deles, que foi determinada acrescentando 5 anos à data em que foram validados ou implementados. Para tal, tive necessidade de consultar uma grande variedade de documentos, o que me permitiu contactar com outros setores e departamentos, explorar o sistema documental da empresa e estimular a minha capacidade de cruzamento de dados, tendo sido uma atividade bastante rica para o meu estágio.

Para reportar a monitorização efetuada desenvolvi uma ferramenta em Excel (tabela pivot) que possibilita a determinação de quantos métodos e que métodos requerem avaliação da sua *performance* e, possivelmente, revalidação, em 2017, 2018, 2019, 2020, 2021 e 2022.

O resultado desta tarefa assume uma grande relevância no âmbito da revalidação de métodos por decisão interna, pois facilita a identificação dos métodos cuja *performance* será avaliada em cada ano até 2022 e, ao ditar o número de métodos a avaliar em cada ano, permite uma melhor organização e alocação de recursos para a avaliação da *performance* dos métodos. Dada a pertinência desta atividade, no término do estágio, efetuei uma apresentação à diretora do departamento do DAG, aos responsáveis pelo DA, à assistente responsável pelo setor das Estabilidades e ao meu orientador de estágio, onde abordei os conhecimentos teóricos que

adquiri sobre o tema e dei a conhecer a metodologia seguida nesta tarefa, a lista de revalidação de métodos, a tabela *pivot* e os resultados e conclusões que retirei da análise da tabela.

1.4.2. Elaboração de *drafts* de Relatórios de Decisão

Previamente à revalidação de um método analítico por decisão interna, procede-se à avaliação da *performance* do método e à consequente elaboração de relatórios de decisão, atividade em que pude participar, através da elaboração de rascunhos destes relatórios. Nestes relatórios compilam-se todos os resultados OoS (*out-of-specification*) e OoT (*out-of-trend*) descritos pelo departamento do Controlo de Qualidade (CQ) e pelo setor das Estabilidades para um dado API ou PSA e identificam-se aqueles que se devem ao método analítico, para além de se registarem os problemas associados aos métodos reportados pelos analistas. Com base nesta avaliação da *performance*, o relatório termina com as conclusões e a decisão a tomar, podendo optar-se por manter o método ou por proceder a uma alteração no método e a uma posterior revalidação, caso a alteração introduzida assim o exija.

A minha intervenção nesta atividade baseou-se na elaboração de *drafts* destes relatórios de decisão, o que contribuiu para me elucidar quanto às dificuldades e erros que podem surgir no decorrer da execução de um método, bem como para me alertar para o facto de que um protocolo analítico não deve dar aso a subjetividade, de modo a que todos os analistas executem de igual forma todas as etapas de um método.

1.5. Interação com Outros Setores

A colaboração entre setores é crucial em IF pois todos eles são interdependentes e, no decurso do estágio, por diversas ocasiões pude testemunhar esta cooperação intersectorial, tendo sido, inclusive, essencial para a realização de algumas das minhas tarefas.

A interação com o departamento do CQ foi determinante para que eu pudesse elaborar uma lista de revalidação de métodos o mais completa possível, já que é este o departamento responsável pela implementação de métodos e, por isso, foi no CQ que tive acesso a dados referentes a este processo. Esta interação permitiu-me, ainda, adquirir mais conhecimentos relativos às implementações. Ademais, para a avaliação da *performance* dos métodos, foi necessário compilar os resultados OoS e OoT e os problemas na execução de métodos reportados pelos analistas do CQ e do setor das Estabilidades, denotando, mais uma vez, a importância da partilha de informação entre setores.

1.6. Promoção do Sentido Crítico

O sentido crítico é uma característica fundamental para qualquer farmacêutico, em particular para um farmacêutico que exerça as suas funções na área da ID em indústria farmacêutica. Ao longo do estágio, em diversas atividades, pude fomentar o meu sentido crítico, tendo-me apercebido da sua importância na área da revalidação de métodos analíticos e na investigação de problemas relacionados com os métodos.

Os casos da elaboração da lista de revalidação de métodos e da criação da tabela *pivot* são um exemplo, pois foi necessário avaliar criticamente os dados recolhidos de diversas fontes, saber formular questões e, sobretudo, saber que respostas ou informações se pretendiam obter com esta tarefa. Ao elaborar *drafts* de relatórios de decisão pude, também, estimular a minha visão crítica, sugerindo ou não a introdução de alterações nos métodos analíticos, com base na existência de resultados OoS, OoT e de problemas atribuíveis ao método.

No setor do DA o sentido crítico é indispensável para a condução de investigações quando se obtêm resultados inesperados e comprometedores ou quando se suspeita da existência de etapas críticas ou de falta de robustez num método. O meu contributo na elaboração de um relatório de investigação foi, assim, mais um fator que apelou a esta característica. A investigação em causa foi conduzida com o intuito de averiguar se alguns resultados obtidos com o método de conteúdo poderiam estar relacionados com o polimorfismo do API ou a formação de um hidrato. Neste sentido, foram analisados os resultados de diferentes técnicas, como a difração de raios-X, a espectroscopia de Raman, a ToF-SIMS (*Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry*) e a LC-MS (Cromatografia Líquida Acoplada por Espectrometria de Massa), o que me permitiu, ainda, adquirir conhecimentos relativos às referidas técnicas.

1.7. Ganho de Autonomia

Ao dar-me a conhecer as principais tarefas que iria realizar, no âmbito da revalidação de métodos, o meu orientador de estágio fez-me compreender qual o seu intuito e a sua relevância, enquadrando-me no tema da revalidação de métodos e explicou-me como deveria proceder para executar as tarefas propostas. Após este enquadramento, pesquisei sobre o tema, iniciei a procura da informação e dos dados necessários, e realizei as atividades com autonomia e com uma atitude proactiva, sendo de ressaltar que pude ver as minhas dúvidas esclarecidas, sempre que surgiam. A liberdade e confiança que me foram concedidas culminou num acréscimo de responsabilidade, pôs-me à prova e fomentou a minha autonomia e a confiança nas minhas capacidades.

2. Análise Interna - Pontos Fracos

2.1. Componente Laboratorial

Aquando da elaboração de *drafts* de relatórios de decisão apercebi-me da complexidade inerente à interpretação dos resultados OoS e dos problemas reportados pelos analistas durante a execução de um método. Assim, e dado que o estágio teve essencialmente um carácter teórico, as minhas interpretações e sugestões para proceder ou não a alterações nos métodos analíticos estiveram limitadas pela minha falta de experiência na execução laboratorial dos mesmos. Porém, só com a experiência ditada pelo tempo é que poderia vivenciar as dificuldades e as etapas críticas dos métodos e, assim, retirar ilações mais facilmente.

2.2. Duração do Estágio

Na minha opinião, a duração do estágio limita a possibilidade de o estagiário percorrer mais do que um setor ou departamento da IF de forma proveitosa. De facto, seria uma mais-valia conhecer-se e experienciar-se o papel de diversos setores e, assim, adquirir uma visão mais abrangente da IF e enriquecer ao máximo a formação. Porém, acredito que a duração de 3 meses torna inviável que tal ocorra, pois iria possibilitar um conhecimento apenas superficial desses departamentos, sem os experienciar devidamente. Deste modo, tendo o estágio curricular esta duração, a minha opinião é de que é mais vantajoso o estágio cingir-se, então, a um só departamento, tal como foi o meu caso, para que não seja puramente observacional, mas sim para que haja uma plena integração no departamento e se realizem atividades que acrescentem valor à empresa.

3. Análise Externa – Oportunidades

3.1. Conhecimento do Funcionamento do Desenvolvimento Analítico

O meu estágio realizado no setor do DA traduziu-se na oportunidade de conhecer aquele que é um setor vital para uma empresa de IF que tenha a ID como um interesse.

Este setor apresenta um papel fulcral no desenvolvimento de novos medicamentos, ao ocupar-se de duas principais atividades: por um lado o desenvolvimento e a subsequente validação de métodos analíticos e, por outro, o apoio ao Desenvolvimento Galénico (DG). O DA é responsável por desenvolver métodos analíticos que visem avaliar parâmetros como o conteúdo em API, as substâncias relacionadas, a dissolução, entre outros, para PSA que estejam a ser desenvolvidos pelo DG e para API cuja monografia oficial seja inexistente. Após submetidos a validação analítica, os métodos estão aptos a ser executados, em rotina, pelo

departamento do CQ e pelo setor das Estabilidades. Ademais, o DA é responsável pela análise de diversos parâmetros de formulações galénicas que estejam em desenvolvimento, fornecendo os dados que permitem orientar o DG no sentido de desenvolver aquela que será a formulação final mais adequada. Para além destas atividades mais direcionadas para o desenvolvimento propriamente dito, o DA concretiza, ainda, a avaliação da *performance* dos métodos analíticos, a revalidação de métodos e a realização de investigações do foro analítico com o intuito de solucionar questões ou problemas reportados ou de otimizar métodos.

Apesar do foco do estágio ter sido a realização de apenas algumas das atividades que se realizam neste setor, a minha presença diária no DA, aliada à partilha de experiências e de lições aprendidas pelos seus profissionais, permitiram-me conhecer ao detalhe o papel deste setor na empresa, como está organizado, quais as suas principais atividades e como é o seu quotidiano. Do mesmo modo, a minha presença nas reuniões semanais do setor do DA, realizadas na presença dos membros do DG, foi fundamental para uma melhor compreensão do funcionamento do setor, na medida em que me manteve ao corrente do plano de atividades do DA para cada semana e de quais os projetos em execução.

Ter-me sido dada a possibilidade de compreender a dinâmica do DAG, área com um impacto cada vez maior na IF, foi, sem dúvida, uma oportunidade conferida pelo estágio, contribuindo para o meu progresso e melhor preparação para o meu futuro profissional.

3.2. Contacto com a Tecnologia dos Filmes Oraís

No estágio tive, ainda, a oportunidade de participar numa atividade que não se encontra no domínio do DA, nomeadamente na produção de placebos de duas formulações de filmes orais BlueOS04, atividade galénica da responsabilidade do departamento de Investigação. Deste modo, pude conhecer um inovador sistema de entrega de fármacos por via oral, os filmes orais, desenvolvido por este departamento e que atualmente já se encontra patenteado, tendo a designação de BlueOS. Esta tecnologia permite a entrega do API diretamente na mucosa oral e assegura um rápido início de ação e uma fácil deglutição, promovendo a adesão à terapêutica.

Os placebos de BlueOS04 foram produzidos a pedido do DA, com o fim de serem utilizados na execução de métodos analíticos em desenvolvimento. A produção dos filmes orais realizou-se no laboratório de *scale-up*, numa sala destinada para o efeito, onde a mistura previamente preparada foi espalhada com o auxílio de um *film applicator* sobre um substrato e, por aplicação de vácuo e de uma temperatura elevada, após secagem, obteve-se um filme com uma espessura previamente definida através do *film applicator*. De seguida, recorrendo a uma prensa manual, os filmes foram cortados nas dimensões pretendidas, tendo-se obtido placebos de BlueOS04.

Esta atividade revelou-se como uma oportunidade para ampliar os meus horizontes, ao contactar com uma nova forma farmacêutica e acompanhar uma atividade galénica, e também para me sensibilizar para a importância do desenvolvimento de tecnologias que permitam responder às necessidades dos doentes, algo que é cada vez mais uma tendência da IF.

3.3. Participação no Embalamento e Expedição de Medicamentos Experimentais

Ao longo do estágio pude, ainda, acompanhar os processos de embalamento e expedição de medicamentos experimentais (ME), sendo esta uma atividade realizada pelo DAG em interface com outros departamentos.

Na sequência do fabrico de ME de acordo com as cGMP, procede-se ao seu embalamento no acondicionamento primário definido para o efeito. Após embalados, os ME, já na forma de produto acabado, são devidamente rotulados, contendo a designação ou código do ME, o número de lote, o prazo de validade, a indicação “*for clinical trial use only*”, entre outras informações, e são colocados no embalamento secundário, também devidamente identificado. No processo que acompanhei procedeu-se, também, à colocação de uma *smartcap*, para fins de monitorização e registo de abertura do frasco.

O processo de expedição de ME ocorre no armazém, sendo necessário garantir que a documentação requerida é enviada juntamente com os produtos acabados para o centro clínico em causa. Estes documentos correspondem aos certificados de análise dos ME, aos certificados de libertação e *compliance* e ao impresso interno de expedição de ME. Com o fim de assegurar que os ME permanecem nas condições adequadas durante o transporte, no embalamento secundário onde são enviados os produtos acabados e a documentação, deve colocar-se um *data logger* que regista a temperatura e, eventualmente a humidade relativa, de modo a monitorizar estas condições até ao local de destino, e deve selar-se convenientemente o embalamento secundário, para garantir a sua inviolabilidade durante o transporte.

A minha participação nestes processos constituiu uma oportunidade de conhecer mais uma atividade fora do âmbito do DA, para além de ampliar a minha bagagem de conhecimentos e enriquecer a minha formação.

3.4. Integração de Conhecimentos Adquiridos no MICF

Durante as várias atividades do estágio foi possível integrar alguns conhecimentos adquiridos no MICF e reforçá-los. No que diz respeito à validação de métodos analíticos, considero que a unidade curricular de Bromatologia e Análises Bromatológicas facultou os conceitos teóricos básicos para compreender mais facilmente este processo, sendo que numa

das suas aulas laboratoriais foi possível, inclusive, avaliar duas características de desempenho de um método. Não obstante, durante o estágio tive a oportunidade de estudar com maior detalhe este processo, assim como os processos de implementação e revalidação de métodos, sobretudo a diferença entre cada um dos três, para a qual ainda não estava muito elucidada.

Por outro lado, aquando da elaboração da lista de revalidação, contactei com um grande número de protocolos analíticos para a execução de diversas técnicas de análise, o que me permitiu relembrar conhecimentos abordados em diversas unidades curriculares, com destaque para a técnica de HPLC estudada, sobretudo, nas unidades curriculares de Métodos Instrumentais de Análise I e II. É de notar que foi precisamente esta a técnica que tive oportunidade de reavivar quando acompanhei a avaliação da linearidade de um método de conteúdo. Esta unidade curricular concedeu-me, ainda, os conceitos de polimorfismo e de algumas das técnicas que o permitem estudar.

Ademais, para a fase de compilação dos resultados OoS reportados e das causas a eles atribuídas, na avaliação da *performance* dos métodos, considero que a unidade curricular de Gestão e Garantia de Qualidade foi importante, na medida em que os conceitos de resultados OoS e de investigação para apurar as causas destes resultados já me eram familiares.

As unidades curriculares de Tecnologia Farmacêutica foram também úteis aquando da preparação das misturas utilizadas para a produção de filmes orais, assim como para mais facilmente entender a função de cada componente na formulação destes filmes e, ainda, para compreender a influência do polimorfismo na estabilidade de medicamentos.

3.5. Aumento dos Conhecimentos em Excel

No decurso do estágio tive a oportunidade de melhorar as minhas competências relativas à folha de cálculo Excel, pois esta constituiu a base para a construção da lista de revalidação de métodos e, sobretudo da tabela *pivot*. Ao explorar as ferramentas do Microsoft Excel®, descobri inúmeras mais-valias que ainda desconhecia deste tipo de *software* e recorri a diversas funcionalidades, desde a aplicação de filtros para selecionar determinados tipos de informações, passando pela inclusão de comentários e pelas opções de cálculo, até à construção de uma tabela *pivot* que contemplasse os dados pretendidos. Atendendo a que o Microsoft Excel® é uma ferramenta de bastante utilidade para diversas finalidades, o desenvolvimento de competências nesta área foi, sem dúvida, muito proveitoso para o meu futuro profissional.

4. Análise Externa – Ameaças

4.1. Referência ao Papel do Farmacêutico no Desenvolvimento Analítico durante o MICF

Em diversas unidades curriculares do MICF foi abordado o papel do farmacêutico de indústria, nomeadamente em Tecnologia Farmacêutica I, II e III, Biotecnologia Farmacêutica, Assuntos Regulamentares do Medicamento, Gestão e Garantia de Qualidade, Comunicação e Marketing Farmacêutico, entre muitas outras. Porém, na minha opinião seria útil que, ao longo do MICF, se aprofundasse um pouco mais o papel do farmacêutico na área do DA, pois esta é uma saída profissional em IF à qual não tem sido dado tanto destaque quanto a outras, como a do DG. Neste sentido, considero que, aquando da exposição e da realização de algumas técnicas e processos do foro analítico durante o MICF, seria benéfico os alunos serem mais sensibilizados para a sua importância quanto à perspectiva profissional, nomeadamente através da demonstração da sua aplicabilidade em áreas como o DA.

Conclusão

Dado que o farmacêutico é tido como o especialista do medicamento, a sua intervenção pode concretizar-se em qualquer uma das etapas do ciclo do medicamento, desde a investigação e desenvolvimento, até à produção, comercialização e gestão do seu ciclo de vida. O estágio em Indústria Farmacêutica na Bluepharma constituiu uma excelente oportunidade para conhecer o quotidiano desta área profissional e, de um modo particular, para experienciar o setor do Desenvolvimento Analítico, setor imprescindível para uma indústria que aposte na investigação e desenvolvimento, algo que é cada vez mais preponderante.

Apesar do meu estágio ter tido como foco atividades no âmbito da revalidação de métodos analíticos, através das quais dei o meu contributo à empresa, pude ainda contactar com atividades que não se relacionam diretamente com o Desenvolvimento Analítico, nomeadamente com a tecnologia dos filmes orais e com o embalamento e expedição de medicamentos experimentais, o que foi também muito importante para a minha formação.

Para além de ter integrado e consolidado conhecimentos teóricos e teórico-práticos adquiridos no MICF, o estágio permitiu fomentar o meu sentido crítico, a minha autonomia, entre outras competências pessoais, bem como a aquisição de novos conhecimentos, tendo culminado no meu enriquecimento pessoal e do meu futuro profissional. É de enaltecer que o estágio superou as minhas expectativas, constituiu uma oportunidade única no meu percurso académico e contribuiu para a minha crescente evolução como Farmacêutica.

Referências Bibliográficas

(1) **Bluepharma – About.** [Acedido a 28 de Março de 2017]. Disponível na Internet:
<https://www.bluepharma.pt/about.php>

(2) **Bluepharma Group.** [Acedido a 28 de Março de 2017]. Disponível na Internet:
<https://www.bluepharma.pt/bluepharmagroup.php>

(3) **Bluepharma – Innovation.** [Acedido a 14 de Abril de 2017]. Disponível na Internet:
<https://www.bluepharma.pt/innovation/>

(4) **Bluepharma – Mission.** [Acedido a 28 de Março de 2017]. Disponível na Internet:
<https://www.bluepharma.pt/mission-vision-values.php>

(5) **Bluepharma – Development.** [Acedido a 29 de Março de 2017]. Disponível na Internet:
<https://www.bluepharma.pt/innovation/development.php>

Joana Maria da Silva Fiteiro

Parte III

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Relatório de Estágio realizado no âmbito da Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Nádía Antunes, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Abreviaturas

DCI – Denominação Comum Internacional

IMC – Índice de Massa Corporal

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

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MNSRM-EF – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica de Dispensa Exclusiva em Farmácia

MSRM – Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

MTBP – Medicamento Tradicional à Base de Plantas

PVP – Preço de Venda ao Público

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats* / Forças, Fraquezas, Oportunidades e Ameaças

Introdução

O estágio curricular constitui a última etapa do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) e é uma unidade curricular que assume uma enorme relevância, ao permitir consolidar e integrar conhecimentos teóricos e práticos adquiridos no decorrer do curso, para além de promover o desenvolvimento de competências e de novos conhecimentos que somente se adquirem no contexto da prática profissional e de proporcionar um primeiro contacto com a realidade da profissão farmacêutica, antes da entrada no mercado de trabalho.

O farmacêutico comunitário tanto pode ser o último profissional de saúde com quem os utentes contactam antes do início da sua terapêutica, como pode ser o primeiro a quem recorrem para dar resposta às suas necessidades. Por conseguinte, o farmacêutico detém uma posição de grande proximidade com a população e é preponderante pela sua responsabilidade social como agente de saúde pública, zelando pela saúde e bem-estar dos seus utentes.

Neste sentido, um estágio curricular em Farmácia Comunitária é, sem dúvida, uma mais-valia, ao proporcionar a aplicação dos conhecimentos adquiridos durante 5 anos, em prol dos utentes, e é uma oportunidade para enriquecer a nossa formação e para experienciar o quotidiano desta que é uma área onde se concretiza o papel do farmacêutico como especialista do medicamento e como promotor do bem-estar e da saúde.

Foi-me dada a oportunidade de realizar um estágio curricular na Farmácia Antunes, em Leiria, o qual decorreu no período entre 10 de Abril de 2017 e 5 de Agosto de 2017, sob a orientação da Dra. Nádía Antunes.

Análise SWOT Fundamentada

O presente relatório prima por uma avaliação crítica do estágio e da minha prestação, onde estão expostas as atividades que realizei e os conhecimentos e competências que adquiri ou que aprofundei no decurso do estágio. Para tal, procedi a uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*) fundamentada, que conta com uma análise interna dos pontos fortes e fracos que marcaram o estágio, bem como com uma análise externa daquilo que considero como oportunidades conferidas pelo estágio e que contribuiriam para o meu enriquecimento profissional e, ainda, dos aspetos que dificultaram o meu melhor desempenho. A utilização desta ferramenta visa, assim, orientar a minha reflexão sobre o que vivenciei durante os cerca de 4 meses de estágio e qual o seu impacto na minha formação.

No esquema abaixo encontra-se representado um esquema da análise SWOT realizada e que irei, de seguida, fundamentar.

Tabela I – Análise SWOT em esquema

	Pontos Fortes	Pontos Fracos
Análise Interna	<ul style="list-style-type: none"> • Localização da farmácia e heterogeneidade da população • Horário de funcionamento • Equipa de trabalho • Componente formativa • Atividades de gestão e organização em farmácia • Período de adaptação ao atendimento ao público • Atividades no âmbito do atendimento ao público <ul style="list-style-type: none"> - Dispensa de medicamentos e de outros produtos de saúde - Dispensa de psicotrópicos e estupefacientes - Prestação de outros serviços farmacêuticos • Robot: sistema automático de armazenamento e distribuição 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparação de medicamentos manipulados
	Oportunidades	Ameaças
Análise Externa	<ul style="list-style-type: none"> • Integração de conhecimentos adquiridos no MICF • Foco para outros produtos de saúde • Interação com o utente e aumento das competências de comunicação 	<ul style="list-style-type: none"> • Associação do nome comercial de medicamentos ao respetivo princípio ativo • Reduzida experiência em indicação farmacêutica

I. Análise Interna - Pontos Fortes

I.1. Localização da Farmácia e Heterogeneidade da População

A Farmácia Antunes situa-se numa zona privilegiada da cidade de Leiria, a Guimarota, que se caracteriza por ser uma área fortemente habitacional e com um elevado fluxo populacional, integra vários estabelecimentos comerciais e de restauração e, ainda, tem por perto o Hospital de Santo André, uma clínica médica e dentária e um centro de podologia, estando, também, situada junto à zona limítrofe urbana e, assim, próxima do meio rural. Deste modo, a população que frequenta a farmácia é muito heterogénea, quer quanto às suas necessidades e à frequência de ida à farmácia, quer quanto a fatores etários, socioeconómicos e culturais. Este foi um aspeto muito positivo que me permitiu contactar com várias situações e personalidades, apelando à aplicação de diversos conhecimentos e à adaptação do meu discurso a cada caso.

1.2. Horário de Funcionamento

A Farmácia Antunes tem um período de funcionamento ininterrupto, estando aberta 24 horas por dia, todos os dias da semana, tal como permite a legislação (1). Este é um horário que distingue a farmácia das demais e possibilita que os utentes se desloquem à farmácia a qualquer hora, especialmente nas suas horas de almoço ou quando regressam a casa ao final do dia, o que é particularmente importante numa área residencial como é a Guimarães.

O horário de funcionamento foi um aspeto importante para o meu estágio, pois mesmo não tendo realizado o horário da noite, prolonguei algumas vezes o meu horário, pelo que me pude aperceber da variação da afluência dos utentes à farmácia ao longo do dia. Assim, presenciei os picos de maior afluxo, sobretudo à hora do almoço e ao final do dia, o que foi muito útil para experienciar a azáfama sentida nesses momentos e aprender a gerir da melhor forma o tempo de atendimento, que não pode ser excessivamente moroso, porém não pode, impreterivelmente, comprometer a qualidade do aconselhamento e do atendimento.

1.3. Equipa de Trabalho

A equipa da Farmácia Antunes é liderada pela Diretora Técnica, Dra. Nádia Antunes, e é constituída por mais cinco farmacêuticos, dois técnicos de farmácia e uma ajudante técnica, para além das duas profissionais encarregues pelo horário noturno. Esta é uma equipa que se destaca pelo seu profissionalismo, competência e dinamismo e que sempre primou pela minha melhor integração e aprendizagem, não só através de conselhos e de explicações que me iam sendo dadas, mas também pela sua inteira disponibilidade e vontade em esclarecer qualquer questão que me surgisse, o que, aliado à boa disposição e simpatia constantes, foi determinante para o meu desempenho e interesse ao longo do estágio.

1.4. Componente Formativa

A componente formativa esteve bem patente durante o estágio, pois toda a equipa se preocupou em garantir-me as explicações e as partilhas de conhecimentos necessárias à compreensão dos vários aspetos inerentes ao quotidiano e à atividade do farmacêutico comunitário, tendo sido elucidada, em especial, quanto às tarefas e às marcas de produtos de dermocosmética, puericultura e fitoterapia pelas quais cada um é responsável.

Aquando da visita de delegados de informação médica à farmácia, pude assistir a pequenas exposições ou formações por eles ministradas acerca dos produtos presentes no *portfolio* da marca que representam e dos seus novos produtos, dos aspetos mais relevantes a ter em conta na hora de aconselhar cada um deles e da sensibilização para a prática de vendas

cruzadas, para além de ter participado em formações promovidas por algumas marcas de produtos de saúde. Este tipo de ações foi essencial para adquirir um conhecimento mais profundo dos produtos existentes na farmácia e para um melhor e mais rico aconselhamento.

1.5. Atividades de Organização e de Gestão em Farmácia

A primeira etapa do meu estágio consistiu na aprendizagem e na realização de um conjunto de atividades de gestão referentes ao aprovisionamento e armazenamento, assim como de gestão de *stocks* de medicamentos e de outros produtos de saúde.

Relativamente ao aprovisionamento, procedi à receção de encomendas, à devolução de produtos aos fornecedores, à regularização de devoluções previamente efetuadas e, ainda, a transferências de produtos para outras farmácias do grupo ou para o posto farmacêutico móvel dependente desta farmácia. Outra tarefa consistiu no armazenamento de medicamentos e produtos de saúde nos locais devidos, nomeadamente num *robot* (sistema automático de armazenamento), em armários deslizantes e fixos e no local de atendimento ao público. A reposição de existências e a verificação dos prazos de validade foram, ainda, atividades que realizei nesta primeira fase e ao longo do estágio, nos momentos de menor afluxo à farmácia.

Este conjunto de atividades de organização e gestão foi crucial para o meu desempenho, na medida em que, por um lado, pude compreender a relevância do *back office* como suporte para um atendimento o mais eficiente possível e, por outro, permitiu-me uma maior familiarização com os diversos produtos da farmácia. Este facto revelou-se determinante para conseguir mais facilmente correlacionar o nome comercial dos medicamentos com o seu princípio ativo, assim como, no caso dos MNSRM e outros produtos de saúde, identificar as suas indicações e posologias e, ainda, para me recordar do local onde cada um se encontra, de modo a diminuir o tempo de procura durante o atendimento.

1.6. Período de Adaptação ao Atendimento ao Público

A segunda fase do meu estágio correspondeu a um período de adaptação, no qual acompanhei atendimentos da restante equipa de trabalho, onde me explicaram quais os passos a seguir num atendimento, que tipo de questões devem ser colocadas ao utente, qual a postura a adotar perante o utente e como o abordar, como utilizar o Sifarma 2000[®] e todas as suas funcionalidades, bem como as do cartão Saúda (cartão das Farmácias Portuguesas) e, sobretudo, onde pude vivenciar alguns dos casos-tipo mais comuns com os quais me poderia deparar. Esta foi, assim, uma fase fulcral, na qual pude, ainda, aprender a gerir o tempo e a atenção entre o Sifarma 2000[®] e o utente durante um atendimento, algo que inicialmente não é uma tarefa fácil, para além de poder também ver esclarecidas as dúvidas que me iam surgindo.

1.7. Atividades no Âmbito do Atendimento ao Público

O atendimento ao público foi a última e mais desafiadora etapa do estágio e possibilitou-me a realização de atividades nas quais o farmacêutico se destaca, tais como a dispensa de medicamentos sujeitos e não sujeitos a receita médica (MSRM e MNSRM, respetivamente) e de outros produtos de saúde, de psicotrópicos e estupefacientes, bem como a prestação de serviços farmacêuticos, tendo, por isso, constituído um ponto forte do estágio.

1.7.1. Dispensa de Medicamentos e de Outros Produtos de Saúde

A dispensa de medicamentos é uma das atividades fundamentais da profissão farmacêutica, estando contemplada no ato farmacêutico (2) e exige a responsabilidade de proporcionar ao utente um aconselhamento adequado e orientado para o uso racional do medicamento.

No caso dos MSRM, perante a receita médica o farmacêutico deve proceder a uma análise atenta, de modo a garantir que não existem duplicações de terapêutica ou interações medicamentosas indicativas de erros de prescrição. É ainda importante questionar o utente quanto à sua intenção de adquirir um medicamento de marca ou genérico e, neste último caso, se tem alguma preferência, por exemplo pelo mais barato ou pelo que já tomava, esclarecendo-o em caso de dúvidas relativas à eficácia dos genéricos. Ademais, quanto às receitas eletrónicas desmaterializadas (receitas sem papel), com as quais contactei predominantemente, caso seja prescrita mais do que uma embalagem, o utente tem a liberdade de escolher a quantidade que pretende levar e de adquirir as restantes embalagens em falta em qualquer farmácia e a qualquer data, desde que dentro da validade (3). Nestes casos, tive o cuidado de atualizar, na guia de tratamento, o número de unidades que podia ainda adquirir ou, no caso de não existir guia de tratamento mas sim uma mensagem no telemóvel, de dar um talão com essa referência, para que os utentes possam gerir a aquisição da sua medicação, dentro da validade estipulada.

A dispensa de MNSRM e outros produtos de saúde é uma atividade na qual o farmacêutico se demarca pelo seu aconselhamento e apelou ao meu sentido crítico, à aplicação de conhecimentos adquiridos em várias unidades curriculares e à seleção dos MNSRM ou de outros produtos de saúde existentes na farmácia mais adequados a cada caso, tendo esta atividade sido um dos pontos fortes do estágio por tudo o que a envolveu e aprendi.

1.7.2. Dispensa de Psicotrópicos e Estupefacientes

Os medicamentos psicotrópicos e estupefacientes são sujeitos a um rígido controlo quanto à sua entrada na farmácia e à sua dispensa, por conterem substâncias que podem causar habituação e dependência e pelo risco da sua utilização em fins ilícitos ou para venda ilegal.

Durante esta fase pude efetuar a dispensa deste tipo de medicamentos, o que requer, concomitantemente, a apresentação da receita médica, a identificação do médico prescritor e o preenchimento de dados identificativos do doente a quem foram prescritos os medicamentos e do adquirente (4). Este processo foi facilitado pelas receitas sem papel, pois tanto os dados do médico, como os do doente surgem automaticamente no sistema, sendo apenas necessário preencher os dados do adquirente. Tal como me foi devidamente explicado e pude verificar, até ao dia 8 de cada mês, a farmácia envia ao Infarmed a listagem das entradas e das saídas dos medicamentos psicotrópicos e estupefacientes, assim como as fotocópias das receitas manuais ou eletrónicas materializadas, devendo, ainda, enviar anualmente o balanço das entradas e das saídas, como forma a controlar o extravio deste tipo de medicamentos.

1.7.3. Prestação de Outros Serviços Farmacêuticos

Mais do que dispensar medicamentos, a farmácia comunitária cada vez mais se posiciona no sentido de prestar outros serviços farmacêuticos que zelem pela promoção da saúde e bem-estar dos seus utentes, sendo este um dos aspetos através dos quais o farmacêutico concretiza o seu papel de agente de saúde pública. A Farmácia Antunes dispõe de uma multiplicidade de serviços farmacêuticos, desde a determinação de parâmetros bioquímicos e fisiológicos, a administração de medicamentos injetáveis e de vacinas não incluídas no plano nacional de vacinação, a execução de testes de gravidez, a medição do peso corporal de bebés e rastreios capilares, até consultas de nutrição quinzenais feitas por uma profissional externa à farmácia.

Ao longo do estágio, em diversas ocasiões procedi à determinação de alguns parâmetros bioquímicos e fisiológicos, tais como a glicémia capilar, o colesterol total, os triglicéridos, a pressão arterial, o peso corporal, a altura e o IMC. É de salientar que a determinação do colesterol total e dos triglicéridos foi realizada através de procedimentos que recorrem a reações enzimáticas e à posterior determinação por espectrofotometria, ao invés da habitual colocação de tiras num aparelho, o que se revelou numa atividade diferenciadora e mais rica do ponto de vista laboratorial. Estes serviços são úteis para a deteção de algumas doenças e para a monitorização da terapêutica, sendo que pude acompanhar diversos casos de utentes que regularmente monitorizavam estes parâmetros na farmácia, como foi o caso de uma utente cuja terapêutica anti-hipertensiva fora sujeita a alteração e que se deslocava quase diariamente para medir a pressão arterial, de modo avaliar a efetividade da nova terapêutica.

A prestação deste tipo de serviços foi um ponto forte do meu estágio, pois constituiu um momento de maior proximidade com o utente, onde pude esclarecer questões e aconselhar medidas não farmacológicas, contribuindo para uma relação de confiança.

1.8. Robot - Sistema Automático de Armazenamento e Distribuição

A existência de um *robot* permite um armazenamento mais eficiente de um grande número de embalagens com base no seu tamanho e tem em conta o seu prazo de validade, seguindo o princípio “*first in, first out*”. A colocação de MSRM e de alguns MNSRM no *robot* permitiu-me um maior contacto com os medicamentos e, assim, a familiarização com os seus nomes e com o aspeto das embalagens. Ademais, a automatização da distribuição pelo *robot*, ao disponibilizar especificamente o medicamento requerido, diminuiu a probabilidade de dispensa errónea de medicamentos com nomes, dosagens ou embalagens semelhantes e, ainda, ao fazê-lo chegar ao local do atendimento, possibilitou-me uma maior disponibilidade para o diálogo com o utente, tendo sido, por todos estes motivos, uma mais-valia para o meu estágio.

2. Análise Interna – Pontos Fracos

2.1. Preparação de Medicamentos Manipulados

Uma das áreas em que o farmacêutico se demarca é a preparação de medicamentos manipulados, que consistem em fórmulas magistrais, se preparadas de acordo com uma receita médica específica para um dado doente, ou em preparados oficinais, se preparadas de acordo com indicações compendiais, destinando-se ao conjunto de doentes assistidos (5). Os manipulados são pedidos quando as formulações existentes no mercado não respondem a necessidades específicas, sobretudo quando se destinam a uso pediátrico ou geriátrico, ou quando se pretendem associar princípios ativos, cuja associação não se encontra no mercado.

Na Farmácia Antunes, os pedidos de medicamentos manipulados não são muito frequentes e, quando surgem, são reencaminhados para a farmácia do grupo que é encarregue pela sua preparação e que possui uma grande variedade de matérias-primas, a Farmácia Lis. Durante o estágio participei na preparação de apenas um medicamento manipulado na Farmácia Lis, designadamente de uma suspensão de nitrofurantoína 1%, terapêutica antibiótica destinada a uma criança, bem como no preenchimento da sua ficha de preparação ([anexo 1](#)), do seu rótulo ([anexo 2](#)) e nos cálculos para o seu preço de venda ao público (PVP) ([anexo 3](#)), de acordo com o legislado (6). Porém, atendendo a que a Farmácia Lis prepara, com bastante regularidade, uma grande diversidade de manipulados, especialmente de soluções, suspensões e pomadas, considero como ponto fraco o facto de não ter participado na preparação de mais medicamentos manipulados, pois poderia ter colocado em prática uma maior amplitude de conhecimentos adquiridos nas unidades curriculares de Tecnologia Farmacêutica e de Farmácia Galénica.

3. Análise Externa – Oportunidades

3.1. Integração de Conhecimentos Adquiridos no MICF

O estágio constituiu uma oportunidade para a integração e consolidação de conhecimentos teóricos e teórico-práticos adquiridos em muitas das unidades curriculares do MICF.

Destas, destaco a unidade curricular de Organização e Gestão Farmacêutica, que foi essencial para que, na primeira fase do estágio, em que realizei atividades no âmbito da organização e gestão em farmácia comunitária, muitos dos conceitos me fossem familiares.

Por outro lado, as unidades curriculares de Farmacologia, assim como a de Farmacoterapia, foram imprescindíveis para a atividade de dispensa de medicamentos, particularmente de MSRM, pois permitiu-me uma maior facilidade em associar os fármacos prescritos pelo médico às indicações terapêuticas a que se destinam, bem como em alertar os utentes para a possível ocorrência de efeitos adversos importantes e de interações, ou para esclarecer eventuais dúvidas relacionadas com a terapêutica instituída. Saliento, ainda, os casos práticos resolvidos na unidade curricular de Avaliação Farmacoterapêutica em Cuidados Primários de Saúde, que em muito se assemelharam a alguns casos que surgiram no quotidiano da farmácia comunitária.

Ao longo do estágio, em diversas ocasiões pude proceder à indicação farmacêutica, tendo tido como pilar a unidade curricular de Intervenção Farmacêutica em Autocuidados de Saúde e Fitoterapia, que me forneceu as bases para decidir quanto à necessidade de encaminhamento médico, de aconselhamento de MNSRM, MNSRM de dispensa exclusiva em farmácia (MNSRM-EF) ou medicamentos à base de plantas existentes na farmácia, bem como de medidas não farmacológicas. Apesar dos muitos e variados casos com que me deparei, de seguida irei expor apenas alguns exemplos da aplicação de conhecimentos no âmbito da indicação farmacêutica.

Exemplo I: Infecções urinárias

Uma situação ainda frequente refere-se a utentes que pretendem adquirir antibióticos sem receita médica. Num destes casos, uma utente com cerca de 50 anos referiu estar com um início de infeção urinária e, dado que o médico lhe prescrevera um antibiótico da última vez em que tal lhe acontecera, pretendia um. Neste sentido, comecei por explicar à utente que não podia ceder qualquer antibiótico sem uma receita médica válida, já que se trata de um MSRM e que a sua prescrição requer um diagnóstico médico e a seleção do antibiótico mais adequado, advertindo-a, ainda, para a problemática das resistências bacterianas. De seguida, questioneei a utente acerca dos seus sinais e sintomas, em particular da existência de sangue na urina ou de dor, ao que me respondeu que não, e que sentia apenas desconforto e vontade

frequente em urinar. Assim, aconselhei à utente um MNSRM classificado como Medicamento Tradicional à Base de Plantas (MTBP), o RoterCysti[®], que contém um extrato seco de folhas de uva-ursina (*Arctostaphylos uva-ursi*) (7). Este MTBP é rico em arbutina, glicósido que atua como pró-fármaco que, ao sofrer hidrólise alcalina a nível renal, origina a hidroquinona, um composto com atividade antibacteriana, estando indicado para o tratamento de sintomas de infeções urinárias ligeiras. Recomendei, ainda, a ingestão de bastante água e alertei para a ida ao médico em caso de pioria ou persistência dos seus sintomas por mais do que 4 dias.

Exemplo 2: Conjuntivite alérgica

Sendo a Primavera uma época propícia ao desenvolvimento de alergias, durante o estágio vários utentes deslocaram-se à farmácia com sinais de conjuntivite alérgica. Um dos casos referiu-se a um utente, a quem primeiramente procurei esclarecer a existência de dor ou de pálpebras coladas com remela, o que indicaria uma situação mais grave, como conjuntivite bacteriana, e requereria encaminhamento para o médico. Não sendo o caso, o utente referiu ter os olhos vermelhos, a lacrimejar e com comichão, algo que lhe é usual nesta época e é condizente com uma situação de conjuntivite alérgica sazonal. Recomendei, assim, um colírio com um anti-histamínico H1, como o cetotifeno (MNSRM-EF, Lidina[®]), 1 gota 2 vezes por dia, por um período máximo de 7 dias, após o qual deve ir ao médico não havendo melhoria (8).

Exemplo 3: Aftas vs. Candidíase oral

A ida à farmácia com o fim de adquirir um produto para as aftas foi algo que ocorreu também algumas vezes ao longo do estágio. Nestes casos, comecei por distinguir se se tratava de aftas ou de candidíase oral, já que em ambas se desenvolvem pequenas úlceras, questionando os utentes se estavam a tomar algum medicamento, tais como corticosteroides (por exemplo por via inalatória) ou antibióticos, pois estas terapêuticas, devido ao seu efeito imunossupressor e desestabilizador da flora saprófita, respetivamente, podem despoletar uma infeção fúngica oral (candidíase), ou se poderia ter a ver, por exemplo, com a ingestão de alimentos ácidos, o que seria indicativo de aftas. Numa destas situações, percebi que um utente estava a terminar a toma de um antibiótico, pelo que, após explicar-lhe que poderia tratar-se de uma candidíase, aconselhei a aplicação de uma suspensão oral do antifúngico nistatina (Mycostatin[®]), 4 vezes ao dia após as refeições, referindo a necessidade do líquido permanecer na boca durante 2 minutos, antes de o engolir (9). As restantes situações referiram-se, de facto, a aftas e para o seu tratamento indiquei um gel de aplicação tópica (Aloclair[®] Plus Gel) que forma um filme protetor da afta, evitando que esta contacte com a saliva ou com os alimentos e que, ao conter ácido hialurónico e aloé vera, promove a sua cicatrização.

3.2. Foco Para Outros Produtos de Saúde

A existência e a dispensa de outros produtos de saúde que não medicamentos foi, sem dúvida, uma oportunidade para fortalecer os meus conhecimentos nestas áreas, tendo sido determinante para o meu enriquecimento profissional e, ainda, pela relevância que cada vez mais assumem para a diferenciação da farmácia e para a multidisciplinaridade do farmacêutico.

É de salientar que, ao longo do estágio pude conhecer a enorme diversidade de produtos de saúde, as suas indicações e as diferenças entre eles, destacando os produtos de puericultura, de higiene e dermocosmética, buco-dentários, de fitoterapia e os suplementos alimentares. Contactei também com medicamentos homeopáticos e com diversos dispositivos médicos, como é o caso dos de apoio a doentes ostomizados ou das meias de compressão elástica, para além dos medicamentos de uso veterinário, para os quais fui confrontada com muitos pedidos, sobretudo de pílulas e desparasitantes internos e externos, tanto para cão como para gato. No que respeita à alimentação especial e dietética, realço a existência de produtos que podem ser indicados como venda cruzada para a preparação de colonoscopias, já que esta requer, antes do jejum de 6 horas, uma dieta específica com grandes restrições, para além da alimentação usada para suprir carências nutricionais nos casos de perda de peso involuntária.

Algumas destas áreas não são abordadas com muito detalhe durante o MICF ou apresentam lacunas, de entre outras e de um modo particular as áreas da puericultura e da homeopatia, pelo que a grande diversidade destes produtos presente na farmácia, aliada às explicações dadas pela equipa de trabalho, deu-me a oportunidade de enriquecer a minha formação. No que respeita aos produtos de dermocosmética, de fitoterapia, suplementos alimentares e a medicamentos de uso veterinário, pude reforçar e aprofundar conhecimentos já adquiridos no MICF, nomeadamente nas unidades curriculares de Dermofarmácia e Cosmética, Plantas Medicinais, Intervenção Farmacêutica em Autocuidados de Saúde e Fitoterapia, e Preparações de Uso Veterinário, tendo tido, assim, a oportunidade de complementar a minha formação.

3.3. Interação com o Utente e Aumento das Competências de Comunicação

A interação com utentes de diferentes faixas etárias, estratos socioeconómicos, diferentes habilitações literárias e, sobretudo, personalidades distintas, revelou-se num desafio em que pude melhorar e evoluir, através da crescente prática e interação com os utentes.

Um bom aconselhamento pressupõe uma atitude de empatia e de escuta ativa, de modo a adaptar as questões em função do utente e da sua situação, para obter a informação mais completa possível sobre o seu caso. Neste ponto, foi fundamental abordar o utente com sentido ético, sem ferir suscetibilidades e salvaguardar a sua privacidade, sobretudo em

situações mais delicadas, como foram os casos, por exemplo, dos pedidos de teste de gravidez ou do atendimento de doentes oncológicos.

Ademais, procurei que a mensagem fosse transmitida aos utentes da forma mais clara, tendo o cuidado de prestar informações relevantes, explicar o porquê de não ceder um determinado medicamento ou da sua situação requerer encaminhamento médico. Para tal, foram essenciais os conhecimentos adquiridos no MICF, assim como o recurso aos membros da equipa de trabalho. A adaptação do discurso em função do utente é crucial para que este entenda a mensagem que se pretende transmitir, já que, caso contrário, a adesão à terapêutica e o uso racional do medicamento podem ficar comprometidos. Como tal, recorri, por vezes, à escrita da posologia, da duração do tratamento e da indicação terapêutica nas embalagens, sobretudo em idosos, polimedicados, quando se tratava de uma nova terapêutica, de um genérico ou de uma embalagem diferentes, ou quando os utentes tinham dificuldade em associar a denominação comum internacional (DCI) presente na guia de tratamento, ao nome comercial.

Apesar da heterogeneidade da população e atendendo a que a mensagem deve ser sempre transmitida com a postura de sobriedade, rigor e confiança que caracterizam o farmacêutico e tem de ser entendida da melhor forma, no decurso do estágio tive a oportunidade de me adaptar às diversas situações com que me deparei no contacto com o público e, assim, melhorar as minhas competências de relacionamento interpessoal e de comunicação.

4. Análise Externa – Ameaças

4.1. Associação do Nome Comercial ao Respetivo Princípio Ativo

Durante o MICF, em diversas unidades curriculares, em particular nas de Farmacologia, é dada primazia ao estudo dos diversos grupos de fármacos sem que estes sejam frequentemente associados aos seus nomes comerciais. De facto, esta foi uma das dificuldades que senti, especialmente na fase inicial de atendimento ao público, na medida em que muitos utentes se referem apenas aos nomes comerciais dos medicamentos, com a agravante de, por vezes, os pronunciarem incorretamente, complicando a minha perceção do medicamento em causa. Esta dificuldade foi sendo superada ao longo do estágio, através do armazenamento de medicamentos, da sempre prestável equipa de trabalho e, em particular, do Sifarma 2000[®], sendo que com a experiência que fui adquirindo, as dificuldades em associar nomes comerciais aos seus respetivos princípios ativos foram sendo cada vez menos frequentes.

Tendo noção da dificuldade que seria estudar a grande diversidade de fármacos e simultaneamente fazer corresponder todos eles aos seus nomes comerciais, não obstante, seria benéfico que ao longo dos 5 anos de curso se fosse fazendo alguma referência a

determinados nomes comerciais, de modo a que os alunos se possam ir familiarizando com estas denominações e, assim, aquando do estágio em farmácia comunitária a associação do nome comercial ao princípio ativo seja mais fácil e intuitiva.

4.2. Reduzida Experiência em Indicação Farmacêutica

Durante a fase de adaptação e quando iniciei o atendimento ao público deparei-me com algumas dificuldades relacionadas com o aconselhamento ideal a prestar ao utente, algo que se deveu, sobretudo, à falta de experiência. Apesar do MICF ter um plano de estudos de excelência e de grande versatilidade e pertinência, o correto aconselhamento em farmácia comunitária depende não só do conjunto de conhecimentos adquiridos no MICF, mas também da experiência diária em contexto real, através do contacto cada vez maior com diversas situações que vão surgindo e do conhecimento da miríade de produtos de saúde existentes na farmácia. Considero, assim, que a realização de casos que simulem o contexto real em diversas unidades curriculares do MICF, no âmbito da farmácia comunitária, o que já se verifica, é, de facto, uma mais-valia, que não deve ser descurada e sim cada vez mais estimulada.

Conclusão

O estágio curricular em Farmácia Comunitária constituiu uma experiência de enorme valor, pois permitiu a integração de conhecimentos teóricos e teórico-práticos adquiridos durante a minha formação académica, assim como o desenvolvimento de aptidões e a aquisição de novos saberes, indispensáveis para o meu futuro profissional. Este meu contacto com a prática profissional confirmou o papel multidisciplinar do farmacêutico que, em farmácia comunitária, tanto exerce funções de gestão, como de especialista do medicamento, assim como de agente de saúde pública, tendo sempre como foco a pessoa do utente.

A interação com os utentes foi um aspeto muito enriquecedor que me permitiu vivenciar a complexidade de aliar um aconselhamento farmacêutico adequado, baseado nos conhecimentos técnico-científicos adquiridos, a uma capacidade de comunicação em função de cada utente, assente em valores deontológicos e éticos.

Saliento, ainda, o impacto da equipa de trabalho no meu desempenho ao longo do estágio, que incitou à realização autónoma de tarefas e sempre se mostrou recetiva a esclarecer qualquer questão e a contribuir para o meu enriquecimento pessoal e profissional.

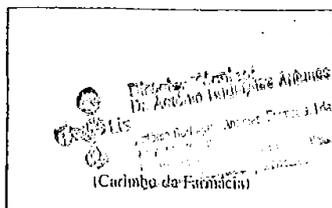
Em suma, o meu estágio foi, sem dúvida, uma mais-valia, pois pude experienciar o quotidiano desta que é uma profissão de grande nobreza e responsabilidade, e engrandecer a minha ideia do papel determinante que cada vez mais o farmacêutico assume na sociedade.

Referências Bibliográficas

- (1) **Decreto-Lei nº 172/2012**, de 1 de Agosto. Diário da República: Série I, nº 148. [Acedido a 22 de Agosto de 2017]. Disponível na Internet: <https://dre.tretas.org/dre/302743/decreto-lei-172-2012-de-1-de-agosto>
- (2) **Lei nº 131/2015**, de 4 de Setembro. Diário da República: Série I, nº 173, Capítulo VII. [Acedido a 24 de Agosto de 2017]. Disponível na Internet: <http://data.dre.pt/eli/lei/131/2015/09/04/p/dre/pt/html>
- (3) **Serviço Nacional de Saúde – Receita Sem Papel – 2016**. [Acedido a 28 de Agosto de 2017]. Disponível na Internet: <http://spms.min-saude.pt/product/receita-sem-papel/>
- (4) **Decreto-Lei nº 15/93**, de 22 de Janeiro. Diário da República: Série I-A, nº 18. [Acedido a 27 de Agosto de 2017]. Disponível na Internet: <https://dre.tretas.org/dre/47946/decreto-lei-15-93-de-22-de-janeiro>
- (5) **Decreto-Lei nº 95/2004**, de 22 de Abril. Diário da República: Série I-A, nº 95. [Acedido a 26 de Agosto de 2017]. Disponível na Internet: <https://dre.tretas.org/dre/171095/decreto-lei-95-2004-de-22-de-abril>
- (6) **Portaria nº 769/2004**, de 1 de Julho. Diário da República: Série I-B, nº 153. [Acedido a 26 de Agosto de 2017]. Disponível na Internet: <https://dre.tretas.org/dre/173222/portaria-769-2004-de-1-de-julho>
- (7) **Resumo das Características do Medicamento - RoterCysti®** - 2016. [Acedido a 29 de Agosto de 2017]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=614422&tipo_doc=rcm
- (8) **Resumo das Características do Medicamento - Lidina®** - 2016. [Acedido a 29 de Agosto de 2017]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=53161&tipo_doc=rcm
- (9) **Resumo das Características do Medicamento - Mycostatin®** - 2015. [Acedido a 29 de Agosto de 2017]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=5846&tipo_doc=rcm

Anexos

Anexo I – Ficha de Preparação de um Medicamento Manipulado



Ficha de Preparação

Medicamento: Suspensão de nitrofurantoina a 1%

Teor em substância(s) activa(s): 100 g (ml ou unidades) contém 1 g (ml) de nitrofurantoina

Forma farmacêutica: Suspensão Data de preparação: 26/07/2017

Número do lote: 104/17 Quantidade a preparar: 100 ml

Matérias-primas	Lote nº	Origem	Farmacopeia	Quantidade para 100 g (ou ml), ou unidades	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Rubrica do Operador e data	Rubrica do Supervisor e data
Xarope Comum	67427	MNGS Mercury	XII	100 mL	100 mL	100 mL	Y. Fiteiro 26/07/17	[Signature] 26/07/17
Nitrofurantoina	17A0063	Pharma	XII	10 cápsulas	10 cápsulas	10 cápsulas	Y. Fiteiro 26/07/17	[Signature] 26/07/17

Preparação

Rubrica do Operador

1. Verificação das condições dos materiais, laboratório e matérias-primas	Y. Fiteiro
2. Retirar o conteúdo das 10 cápsulas para um vidro de relógio e daí para um almofariz de porcelana	Y. Fiteiro
3. Adicionar cerca de 30 mL de xarope comum em pequenas porções e incorporar o pó no xarope comum	Y. Fiteiro
4. Transferir a suspensão para uma proveta rolhada	Y. Fiteiro
5. Lavar o almofariz com xarope comum e transferir para a proveta rolhada	Y. Fiteiro
6. Fez fazer o volume de 100 mL com xarope comum	Y. Fiteiro

Rubrica do Director Técnico [Signature]	Data 26/07/17
--	------------------

7.	Agitação manual até à obtenção de uma suspensão com aspeto homogéneo	J. Fiteiro
8.	Controlo de qualidade	J. Fiteiro
9.	Acondicionamento em frasco de vidro e rotulagem	J. Fiteiro
10.		
11.		
12.		
13.		
14.		
15.		
16.		

Aparelhagem usada:

- Vidro de relógio
- Espátula metálica
- Alorno lariz de porcelana
- Funil de vidro
- Probeta rolhada graduada de 100 mL

Embalagem

Tipo de embalagem: Frasco de vidro âmbar tipo III

Capacidade do recipiente: 100 mL

Material de embalagem	Nº do lote	Origem
<u>Vidro âmbar tipo III</u>		

Operador: J. Fiteiro

Rubrica do Director Técnico 	Data <u>26/07/17</u>
--	-------------------------

Prazo de utilização e Condições de conservação

<p>Condições de conservação:</p> <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Frio (2°C a 8°C)</p> <p style="text-align: right;">Operador: <u>J. Fiteiro</u></p>
<p>Prazo de utilização:</p> <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">14 dias</p> <p style="text-align: right;">Operador: <u>J. Fiteiro</u></p>

Rotulagem

1. Proceder à elaboração do rótulo de acordo com o modelo descrito em seguida.

2. Anexar a esta ficha de preparação uma cópia, rubricada e datada, do rótulo da embalagem dispensada.

Ver Anexo II

Modelo de rótulo

Identificação da Farmácia Identificação do Director-Técnico Endereço e telefone da Farmácia	Identificação do Médico prescriptor Identificação do Doente
DENOMINAÇÃO DO MEDICAMENTO	
Teor em substância(s) activa(s) Quantidade dispensada Referência a matérias-primas cujo conhecimento seja eventualmente necessário para a utilização conveniente do medicamento Posologia Via de administração	Data da preparação Prazo de utilização Condições de conservação N° do lote Manter fora do alcance das crianças Advertências (precauções de manuseamento, etc.) Uso externo (caso se aplique) (em fundo vermelho)

Operador: J. Fiteiro

Verificação

Ensaio	Especificação	Resultado	Rubrica do Operador
Características Organolépticas: - Cor - Odor - Aspecto	- Amarelada - Zombazo - Homogéneo	Conforme	J. Fiteiro

Rubrica do Director Técnico 	Data 26/07/17
---------------------------------	------------------

Ensaio	Especificação	Resultado	Rubrica do Operador
pH	4,5 - 6,5	Conforme	y. Fiteiro
Quantidade	100 ml	Conforme	y. Fiteiro

Aprovado Rejeitado
 Supervisor: João Silva 26/07/17

Nome e morada do doente

Nome do prescriptor

Anotações

1 cápsula — 100 mg x = 10 cápsulas
 x — 1000 mg

Rubrica do Director Técnico <i>NS</i>	Data <u>26/07/17</u>
--	-------------------------

Anexo II – Rótulo da Embalagem Dispensada



Anexo III – Cálculo do Preço de Venda ao Público do Medicamento Manipulado

Cálculo do preço de venda

MATÉRIAS-PRIMAS:							
matérias-primas	embalagem existente em armazém		preço de aquisição de uma dada quantidade unitária (s/IVA)		quantidade a usar	factor multiplicativo	valor da matéria-prima utilizada na preparação
	quantidade adquirida	preço de aquisição (s/IVA)	quantidade unitária	preço			
Xarope Comum	1,2	5,07 €	1 cm ²	0,00507	x 100 ml	x 1,6	= 0,81 €
					x	x	=
					x	x	=
					x	x	=
					x	x	=
					x	x	=
subtotal A							0,81 €
HONORÁRIOS DE MANIPULAÇÃO:							
	forma farmacéutica	quantidade	F(€)	factor multiplicativo	valor		
valor referente à quantidade base	Suspensão	100 ml	4,92	x 3	= 14,76 €		
valor adicional				x	x	=	
subtotal B							14,76 €
MATERIAL DE EMBALAGEM:							
material de embalagem	preço de aquisição (s/IVA)	quantidade	factor multiplicativo	valor			
Frasco de vidro âmbar de 100 ml	0,95 €	x 1	x1,2	= 1,14 €			
		x	x1,2	=			
		x	x1,2	=			
		x	x1,2	=			
subtotal C							1,14 €
PREÇO DE VENDA AO PÚBLICO DO MEDICAMENTO MANIPULADO:				(A + B + C) x 1,3	21,72 €		
				+ IVA	6%		
				D	23,03 €		
DISPOSITIVOS AUXILIARES DE ADMINISTRAÇÃO:							
dispositivo	preço unitário	quantidade	valor				
			E				
PREÇO FINAL: D + E				23,03 €			
Operator: <u>g. Filiz</u>				Supervisor: <u>João Silva</u>			

Rubrica do Director Técnico <u>[assinatura]</u>	Data 26/07/17
--	------------------