

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Medicina Personalizada: Desafio para os Farmacêuticos?

Diogo Galla Gaspar Tonicher

Monografia orientada pela Professora Doutora Maria de Jesus Perry,
Professora Auxiliar.

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2024

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



Medicina Personalizada: Desafio para os Farmacêuticos?

Diogo Galla Gaspar Tonicher

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia orientada pela Professora Doutora Maria de Jesus Perry,
Professora Auxiliar.

2024

Agradecimentos

Ao longo destes cinco anos tive a oportunidade de vivenciar inúmeras experiências nesta Faculdade a que chamo Casa. Foi nela que vivi várias montanhas-russas de emoções e que criei memórias que ficarão para sempre no meu coração. Um obrigado não chega para agradecer a todas as pessoas que me proporcionaram momentos inesquecíveis ao longo desta jornada. No entanto, não podia deixar de agradecer às pessoas que fizeram de mim a pessoa que sou hoje e que vos apresenta esta Monografia com o sentimento de dever cumprido após cinco anos de um curso que correspondeu a todas as expectativas que eu tinha e que por si só eram elevadas.

À Professora Maria de Jesus Perry, muito obrigado por toda a disponibilidade, ajuda e, acima de tudo, ao à vontade para expor as minhas ideias e levar a Monografia no caminho que, para mim, era o mais indicado.

Aos meus Pais e Irmãos, muito obrigado por todo o apoio ao longo do curso. A confiança que depositaram em mim e no meu trabalho fez-me acreditar que era possível chegar cada vez mais longe.

À Carolina, muito obrigado por teres estado ao meu lado em todos os momentos, principalmente nos mais complicados. Sem o teu apoio, confiança e, acima de tudo, amor esta jornada não tinha sido a mesma. Que seja assim para sempre.

À minha Família, muito obrigado por toda a paciência e por todas as vezes que não pude estar convosco porque tinha coisas para fazer da Faculdade.

Aos meus Amigos, muito obrigado por todas as memórias que criámos e que fizeram destes cinco anos uma aventura incrível.

E, por último, um obrigado do fundo do coração a todas as pessoas que de uma maneira ou de outra marcaram o meu percurso académico.

Declaração

Declaro ter desenvolvido e elaborado o presente trabalho em consonância com o Código de Conduta e de Boas Práticas da Universidade de Lisboa. Mais concretamente, afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de fraude académica, que aqui declaro conhecer, e que atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, assumindo na íntegra as responsabilidades da autoria.

Resumo

A Medicina Personalizada abriu um novo capítulo de desafios e novos paradigmas na área da Saúde que têm trazido cada vez mais esperança e inovação. É de uma forma otimista que todos os Profissionais de Saúde encaram esta nova realidade no que diz respeito aos Cuidados de Saúde, principalmente os Farmacêuticos que enfrentam agora inúmeros desafios nas suas várias áreas de atuação.

As Terapias Gênicas e Celulares têm revolucionado a área da Saúde nas mais variadas vertentes pela sua precisão, pela sua complexidade e pelas expectativas e incertezas quanto ao futuro, dado o seu elevado custo e escasso financiamento. Os Farmacêuticos são elementos importantes das equipas que permitem o acesso a este tipo de terapêuticas uma vez que, devido ao seu extenso e variado conhecimento, atuam nestas áreas. O Farmacêutico deverá trabalhar e colaborar na descoberta de novas terapias através da investigação de novos vetores e mecanismos, deverá ter um largo conhecimento relativamente às terapêuticas existentes para as várias patologias para as poder comparar e identificar qual deverá ser utilizada em determinado doente e situação, deverá ter uma enorme presença nos processos regulamentares para a aprovação destas terapêuticas e deverá estar dentro das negociações para o financiamento e aquisição deste tipo de terapias, uma vez que com o seu conhecimento poderá dar um contributo importante na avaliação custo/benefício.

Quer seja em Investigação, em Ensaio Clínicos, em Análises Clínicas, em Indústria, na área Hospitalar ou na área Regulamentar, os Farmacêuticos são fulcrais para que a Medicina Personalizada seja implementada e possa trazer cada vez mais qualidade de vida às pessoas. A Medicina Personalizada é o presente e será o futuro da área da Saúde e os Farmacêuticos deverão ser os impulsionadores e líderes para que a mesma tenha um impacto inigualável no tratamento de patologias raras e sem tratamento eficaz até à data.

Palavras-chave: Medicina Personalizada; Farmacêuticos; Terapias Gênicas; Terapias Celulares.

Abstract

Personalised Medicine has opened up a new chapter of challenges and new paradigms in the area of Health that have brought increasing hope and innovation. All Healthcare Professionals are optimistic about this new reality when it comes to Healthcare, especially Pharmacists, who are now facing numerous challenges in their various areas of activity.

Gene and Cell Therapies have revolutionised Healthcare in a wide variety of areas due to their precision, their complexity and the expectations and uncertainties about their future, given their high cost and scarce funding. Pharmacists are important members of the teams that enable access to this type of therapy, as they work in these areas due to their extensive and varied knowledge. Pharmacists must work and collaborate in the discovery of new therapies through research into new vectors and mechanisms, they must have extensive knowledge of existing therapies for the various pathologies in order to be able to compare them and identify which one should be used in a particular patient and situation, they must have a huge presence in the regulatory processes for the approval of these therapies and they must be involved in the negotiations for the financing and acquisition of these types of therapies, since their knowledge can make an important contribution to the cost/benefit assessment.

Whether in Research, Clinical Trials, Clinical Analyses, Industry, in the Hospital area or in the Regulatory Affairs area, Pharmacists are key to the implementation of Personalised Medicine and to bringing people an ever better quality of life. Personalised Medicine is the present and will be the future of healthcare and pharmacists must be the driving forces and leaders to ensure that it has an unparalleled impact on the treatment of rare pathologies that have not yet been effectively.

Keywords: Personalised Medicine; Pharmacists; Gene Therapy; Cell Therapy.

Índice:

Abreviaturas.....	8
1 Introdução	9
2 Objetivos.....	10
3 Materiais e Métodos.....	11
4 Terapias Gênicas.....	12
4.1 Terapias Gênicas e a sua Evolução.....	12
4.2 Metodologias de Administração, Vetores e Estratégias Terapêuticas	15
4.2.1 Metodologias de Administração	15
4.2.2 Vetores	17
4.2.3 Estratégias Terapêuticas.....	20
4.3 A Atualidade e o Futuro.....	22
5 Terapias Celulares.....	26
5.1 Terapias Celulares e a sua Evolução.....	26
5.2 Células Terapêuticas, Terapias Unicelulares e Multicelulares e Estratégias de Implementação das Terapias.....	28
5.2.1 Células Terapêuticas	28
5.2.2 Terapias Unicelulares e Multicelulares.....	30
5.2.3 Estratégias de Implementação das Terapias Celulares	30
5.3 A Atualidade e o Futuro.....	32
6 Farmacêuticos e os Desafios na Medicina Personalizada.....	36
6.1 Investigação e os seus Desafios	36
6.2 Ensaio Clínico e Análises Clínicas e os seus Desafios	37
6.3 Indústria Farmacêutica e os seus Desafios.....	38
6.4 Farmácia Hospitalar e os seus Desafios.....	40
6.5 Assuntos Regulamentares e os seus Desafios	41
7 Perspetivas Futuras	42
8 Conclusões	44
Referências Bibliográficas	45

Índice de Figuras:

Figura 1.1 Esquema explicativo de uma Terapia Génica (7).....	13
Figura 1.2 Cronologia de acontecimentos marcantes ao longo da evolução das Terapias Gênicas. Adaptado de (19).....	15
Figura 1.3 Metodologias de Administração de Terapias Gênicas. Adaptado de (25) .	17
Figura 1.4 Mecanismo de ação dos vetores não virais na Terapia Génica. Adaptado de (27).....	19
Figura 1.5 Vetores utilizados em ensaios clínicos para Terapias Gênicas. Adaptado de (32).....	20
Figura 1.6 Terapias Celulares com células autólogas e alogênicas. Adaptado de (60)	26

Índice de Tabelas:

Tabela 1.1 Terapias Gênicas aprovadas atualmente pela EMA e FDA	23
Tabela 1.2 Exemplo de uma Terapia Celular aprovada pela FDA que utiliza uma das estratégias mencionadas.....	33
Tabela 1.3 Terapias Celulares com CAR-T aprovadas pela EMA e FDA	33

Abreviaturas

AADC - Deficiência de Eficiência da Descarboxilase dos L-Aminoácidos Aromáticos

ASO - Oligonucleótido *Antisense*

AUE - Autorização de Utilização Excepcional

CFDA - *China Food and Drug Administration*

CFT - Comissão de Farmácia e Terapêutica

DLBCL - Linfoma Difuso de Grandes Células B

DNA - Deoxyribonucleic Acid - Ácido Desoxirribonucleico

FDA - *Food and Drug Administration*

HGPRT - Hipoxantinaguanina Fosforiboxiltransferase

iRNA - RNA de Interferência

LLA - Leucemia Linfoblástica Aguda

MVL - Vírus da Leucemia Murina

PAP - Programa de Acesso Precoce

RISC - *RNA-induced silencing complex*

RNA - *Ribonucleic Acid* - Ácido Ribonucleico

SCID - Imunodeficiência Combinada Grave

SPV - Vírus do Papiloma Shope

UE - União Europeia

ZFN - Nucleases Dedos de Zinco

1 Introdução

A Medicina Personalizada tem emergido em larga escala ao longo dos últimos anos, focando-se na prevenção, adequação e adaptação das terapias às características individuais das pessoas. Sendo a Medicina Personalizada uma área bastante abrangente, engloba, entre outras, as Terapias Gênicas e Celulares, que utilizam o elevado conhecimento do genoma humano e das células para desenvolver terapêuticas específicas. Esta área tem evoluído ao longo dos últimos anos devido ao enorme trabalho realizado pelos Profissionais de Saúde, principalmente os Farmacêuticos que têm encontrado cada vez mais oportunidades e desafios.

As Terapias Gênicas envolvem a introdução, remoção ou alteração de material genético nas células de um doente, com o objetivo de tratar ou prevenir doenças já conhecidas e relacionadas com os genes. Esta ideia surgiu há bastantes anos, mas apenas em 1990 é que se obteve o primeiro ensaio clínico bem sucedido, onde se tratou uma criança com Imunodeficiência Combinada Grave (SCID) (1). Atualmente, as Terapias Gênicas estão na vanguarda da inovação e têm proporcionado cada vez mais desafios aos Profissionais de Saúde.

Paralelamente, as Terapias Celulares, que utilizam células vivas para tratar determinadas patologias, têm sido usadas como terapias para doenças raras ou sem tratamento até então. Embora resultem dela inúmeros desafios, esta área tem sido fulcral no combate a determinadas doenças, principalmente oncológicas, como leucemias e linfomas, uma vez que a utilização das células CAR-T geneticamente modificadas do doente têm tido resultados impressionantes.

Posto isto, os Farmacêuticos são elementos de mudança trazendo inovação, descoberta, monitorização e aperfeiçoamento da Medicina Personalizada. Devido à sua elevada multidisciplinaridade estão incluídos em muitos dos processos e áreas que são responsáveis por todas estas tarefas. Os desafios para os Farmacêuticos serão cada vez maiores e com eles irá aumentar a responsabilidade e o compromisso para que a área da Saúde possa prosperar cada vez mais, aumentando a qualidade de vida do ser humano.

2 Objetivos

Esta Monografia tem como objetivo aprofundar o conhecimento sobre a Medicina Personalizada, mais especificamente as Terapias Gênicas e Celulares, e os desafios que as mesmas colocam e colocarão aos Farmacêuticos. Dado o seu vasto conhecimento, os Farmacêuticos são fulcrais nas mais variadas áreas e funções, enfrentando inúmeros desafios diariamente.

O principal objetivo será identificar as várias áreas e funções onde os Farmacêuticos deverão intervir e enfrentar desafios e enunciá-los, sendo que estes os farão ser os principais impulsionadores do crescimento destas terapias e proporcionar maior acesso às mesmas.

3 Materiais e Métodos

A metodologia utilizada na elaboração desta Monografia baseia-se em três vertentes que se complementam para o resultado final: revisão bibliográfica de artigos científicos, entrevistas a pessoas chave nas áreas abordadas para recolher os seus *inputs* e opiniões e ainda uma reflexão pessoal. O trabalho foi elaborado de janeiro de 2024 até junho de 2024.

Foi realizada uma revisão bibliográfica de artigos científicos, recorrendo a um conjunto de recursos online: PubMed, EMA, Infarmed, FDA, Google Scholar, Science Direct by Elsevier e ainda alguns jornais e websites de renome. Foram analisados alguns artigos específicos que serviram para demonstrar e concluir algumas questões importantes relacionadas com o tema. Para filtrar a pesquisa foram tidas em consideração as datas de publicação dos vários artigos analisados, em inglês e em português. Foram utilizadas algumas palavras-chave como: *Personalised Medicine, Pharmacists, Gene Therapy, Cell Therapy, Challenges, Future Prospects*, Medicina Personalizada, Farmacêuticos, Terapias Génicas, Terapias Celulares, Desafios e Perspetivas Futuras.

No que diz respeito às entrevistas realizadas, as mesmas foram feitas principalmente a Farmacêuticos, das mais variadas áreas, que me ajudaram a identificar os principais desafios e lacunas. Estas pessoas não serão identificadas ao longo da Monografia por pedido expresso. As pessoas entrevistadas trabalhavam em áreas que serão abordadas ao longo da Monografia ou diretamente com as Terapias Génicas ou Celulares, sendo membros das seguintes empresas/associações: Novartis, Pfizer, Ordem dos Farmacêuticos, Associação Portuguesa dos Farmacêuticos Hospitalares, Hospital São Francisco Xavier e Farmácia Marbel.

A minha opinião pessoal foi baseada numa reflexão profunda após leitura do material recolhido.

4 Terapias Génicas

4.1 Terapias Génicas e a sua Evolução

A compreensão e o conhecimento da influência da genética e dos genes na definição de um organismo e a forma como modificações na sequência do ácido desoxirribonucleico (DNA) podem originar alterações estruturais e metabólicas, é fundamental para que se possam descobrir genes que estão associados a determinadas patologias e que poderão ser utilizados como alvos terapêuticos (2).

Atualmente, conhecem-se mais de 7000 doenças raras descobertas em todo o mundo, sendo que 95% das mesmas não têm nenhuma terapêutica aprovada. Destas doenças, cerca de 80% são de origem genética e representam uma enorme área de trabalho ainda por desvendar (3). Estima-se que na Europa cerca de 5% da população esteja afetada por uma doença genética o que, em Portugal, significa mais de 500 mil pessoas (4). Esta realidade leva a que cada vez mais as doenças raras, como as Doenças de Gaucher, de Pompe e de Fabry, sejam objeto de investigação nomeadamente no que diz respeito ao desenvolvimento das Terapias Génicas.

As Terapias Génicas envolvem a introdução, remoção ou alteração de material genético nas células de um doente, com o objetivo de tratar ou prevenir doenças já conhecidas e relacionadas com os genes. Embora não existam muitas Terapias Génicas aprovadas, existem inúmeros ensaios clínicos a ser realizados pelas mais variadas empresas e pelo mundo inteiro, uma vez que se prevê que as mesmas poderão vir a tratar doenças que têm um elevado impacto na sociedade. Isto acontece devido ao elevado potencial de tratamento de doenças causadas por distúrbios genéticos recessivos (fibrose cística, hemofilia, distrofia muscular e anemia falciforme), doenças génicas adquiridas, como o cancro, e certas infeções virais como a SIDA (5).

Estas terapias constituem uma nova abordagem de tratamento, verdadeiramente transformadora, através da qual um gene funcional é transferido para o órgão-alvo do organismo com o objetivo de produzir uma proteína em falta ou que não funciona devido à presença de variantes do gene. Ao utilizar genes como medicamentos, é possível tratar a causa subjacente de uma doença ao nível celular, potencialmente com apenas uma dose (6).

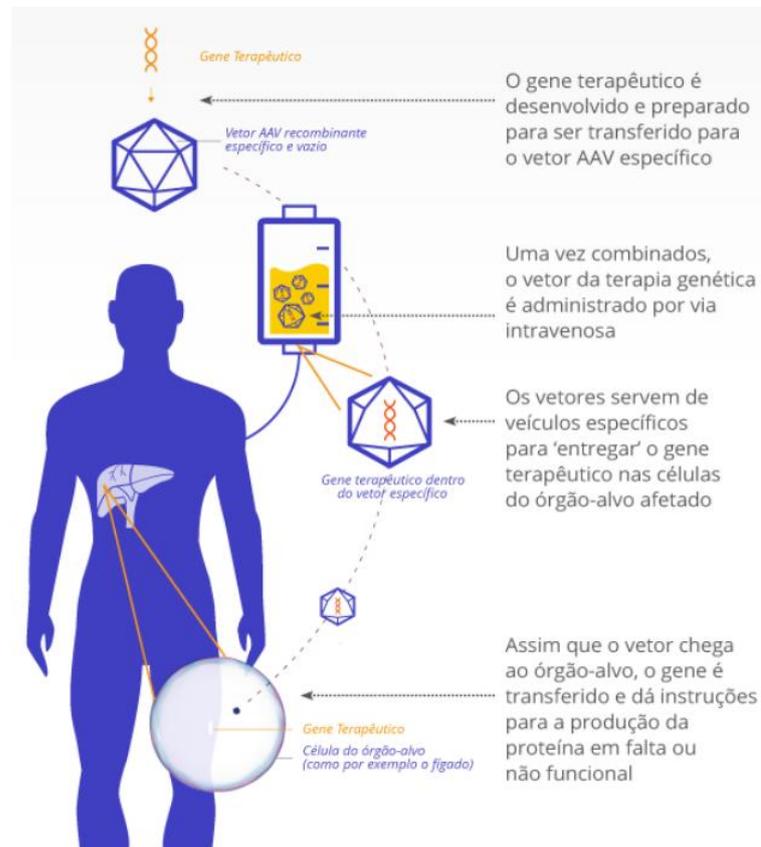


Figura 1.1 Esquema explicativo de uma Terapia Génica (7)

Para chegarmos ao patamar onde nos encontramos atualmente, ocorreu uma evolução imensa ao longo dos últimos anos. Os primeiros passos na história da Terapia Génica aconteceram em 1952, quando Zinder e Lederberg descobriram que os bacteriófagos podiam transferir material genético (8). Esta descoberta levou a uma pesquisa realizada por Waclaw Szybalski que concluiu que os genes eram transferidos, modificados e regulados (9).

Em 1962, Szybalski demonstrou a primeira transferência hereditária de genes, com base na via alternativa para a síntese de ácidos nucleicos, principalmente a purina, que utiliza a enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferase (HGPRT) (9). Posteriormente, com recurso a células embrionárias de galinha infetadas com o vírus de Sarcoma Rous, Howard Temin reforçou o conhecimento de que as variantes genéticas podiam ser herdadas de forma estável e evidenciou a importância dos vírus como vetores, uma vez que estes conseguiam entregar os genes nas células de interesse (10).

O primeiro ensaio clínico realizado em seres humanos foi feito em 1968 por Rogers e Pfuderer, onde se utilizou o *wild type* do Vírus do Papiloma Shope (SPV) com

o objetivo de que este codificasse para a arginase, uma vez que os doentes em estudo tinham hiperargininemia, uma doença metabólica hereditária do ciclo da ureia. No entanto, os resultados terapêuticos não foram muito promissores (11). Passado uns anos e sem autorização, Martin Cline utilizou o gene que codifica para a β -globulina humana e inseriu-o *in vitro* em células de doentes com β -talassemia, o que levou a que este fosse fortemente criticado por toda a comunidade científica, levantando inúmeras discussões éticas sobre as consequências da manipulação genética do ser humano (12).

Em 1989, Rosenberg realizou a primeira transferência aprovada de genes exógenos no ser humano, ao usar o Vírus da Leucemia Murina (MVL), o primeiro vetor retroviral a ser modificado, no qual foi inserido o gene marcador resistente à neomicina, em linfócitos infiltrantes de tumor, que foram re-administrados aos doentes com melanomas metastáticos. Este estudo, apesar de ter uma amostra pequena e efeitos anti-tumorais temporários, confirmou a viabilidade e a segurança da terapia génica em humanos (13). Passado um ano, em 1990, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou, pela primeira vez, um ensaio clínico em duas doentes com SCID (14).

Apesar dos elevados resultados promissores em vários estudos e ensaios, após a morte de Jesse Gelsinger em 1999, uma jovem de 18 anos que participava num ensaio clínico, levantaram-se várias questões relativamente às Terapias Génicas. No entanto, o número de ensaios clínicos continuou a aumentar exponencialmente e o interesse pela área foi crescendo com o passar dos anos (15).

Em 2003, a China foi o primeiro país a aprovar uma terapêutica com base nas Terapias Génicas, através da *China Food and Drug Administration* (CFDA). A terapia, denominada de Gendicine, encontrava-se indicada para o tratamento de tumores de células escamosas da cabeça e do pescoço (16). Em 2012, a *European Medicines Agency* (EMA) concedeu a primeira autorização de introdução no mercado para um produto com base na terapia génica, o Glybera, composto por um vetor adenoassociado que expressa a lipase proteica, para o tratamento da Deficiência de Lípase Proteica (17). No entanto, este medicamento foi retirado do mercado em 2017 por apresentar baixa evidência de persistência dos benefícios clínicos (18). Atualmente, existem várias Terapias Génicas já aprovadas na Europa e nos Estados Unidos da América e estão a ser realizados ensaios clínicos em larga escala.

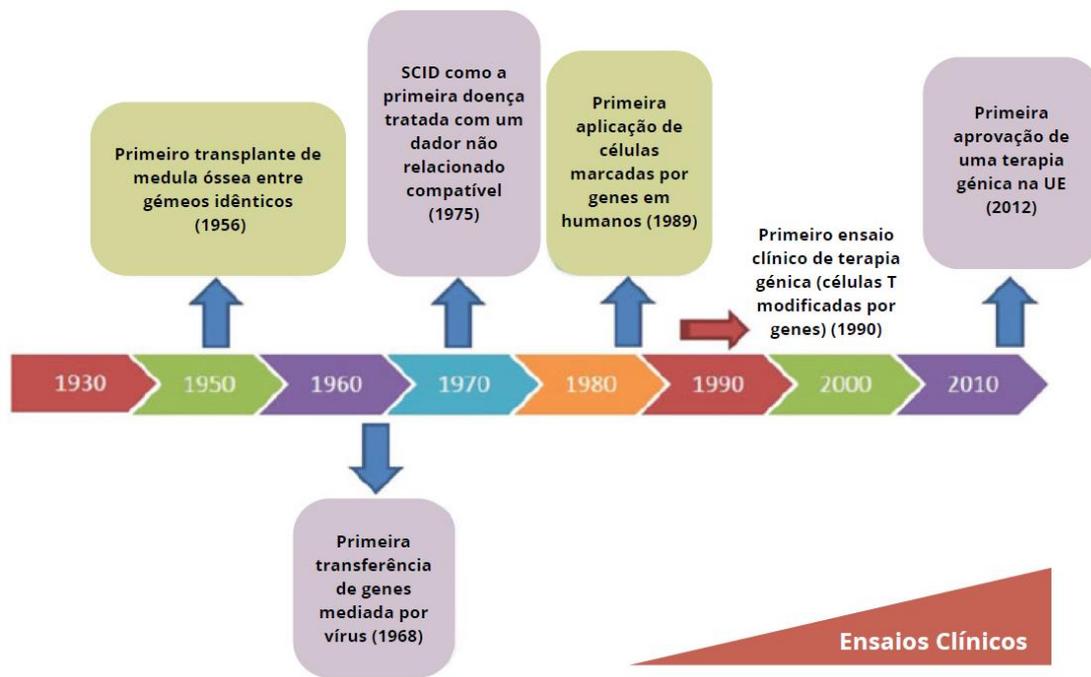


Figura 1.2 Cronologia de acontecimentos marcantes ao longo da evolução das Terapias Génicas. Adaptado de (19)

4.2 Metodologias de Administração, Vetores e Estratégias Terapêuticas

4.2.1 Metodologias de Administração

A seleção de uma via de administração que garanta que o material genético chega ao seu alvo é uma das etapas mais importantes para o sucesso das Terapias Génicas. Assim, para que a terapia atinja o alvo pretendido são escolhidas metodologias apropriadas de acordo com o seu grau de adequabilidade, devendo ser o mais exatas possível para que exista uma maximização do efeito terapêutico e para que não exista nenhuma alteração indevida nas estruturas circundantes. Este é um dos principais focos da investigação na área das Terapias Génicas e, por isso, além de ser diferente consoante o tipo de terapêutica, pode ser ainda realizada de duas maneiras distintas: *in vivo* e *ex vivo* (20).

As metodologias *ex vivo*, como o nome indica, são realizadas fora do organismo e, posteriormente, são transplantadas para o mesmo. Este tipo de processo é realizado diretamente com as células do indivíduo que irá ser tratado e segue um fio condutor bastante padronizado: colheita das células, a alteração e introdução do gene através de

um vetor, a expansão *in vitro* e, por último, as células são reintroduzidas no organismo original (Figura 1.3) (20).

Esta metodologia tem inúmeras vantagens, desde o facto de não existir exposição direta do doente ao vetor até à existência de menor risco de alcance da linhagem germinativa (20). No entanto, o facto de apenas estar limitada a células mitóticas acaba por comprometer por vezes a sua utilização. Algumas das terapêuticas atualmente aprovadas utilizam esta metodologia de administração: Kymriah, utilizado no tratamento da leucemia linfoblástica aguda de células B refratárias (21); Zalmoxis, indicado para doentes que tenham recebido transplantes de células estaminais, em caso de patologias hematológicas (22).

Por outro lado, nas metodologias *in vivo*, as modificações das células acontecem no interior do organismo após uma administração do material genético que introduz o transgene, com recurso a um vetor, diretamente na célula, tecido ou órgão alvo. Neste tipo de administração, quer o ácido nucleico quer o vetor de entrega deverão ter dimensões bastante reduzidas (23).

Contrariamente à metodologia *ex vivo*, uma das desvantagens da metodologia *in vivo* é que requer uma entrega altamente direcionada para que não atinja tecidos indesejados, o que poderia levar à difusão de vetores por todo o organismo, que levaria ao desencadear de uma resposta imunológica que poderia ser comprometedora para o doente (20, 24).

Esta técnica tem sido utilizada maioritariamente em patologias associadas à perda de uma função específica ou variante patogénica, uma vez que o gene inserido tem como objetivo substituir o ausente ou alterado.

A metodologia *in vivo* pode ser feita sistemicamente ou *in situ*. No que diz respeito à entrega sistémica, esta é feita na circulação sanguínea sistémica, evitando muitas das vezes o efeito de primeira passagem. Relativamente à entrega *in situ*, esta engloba a entrega diretamente no local de interesse.

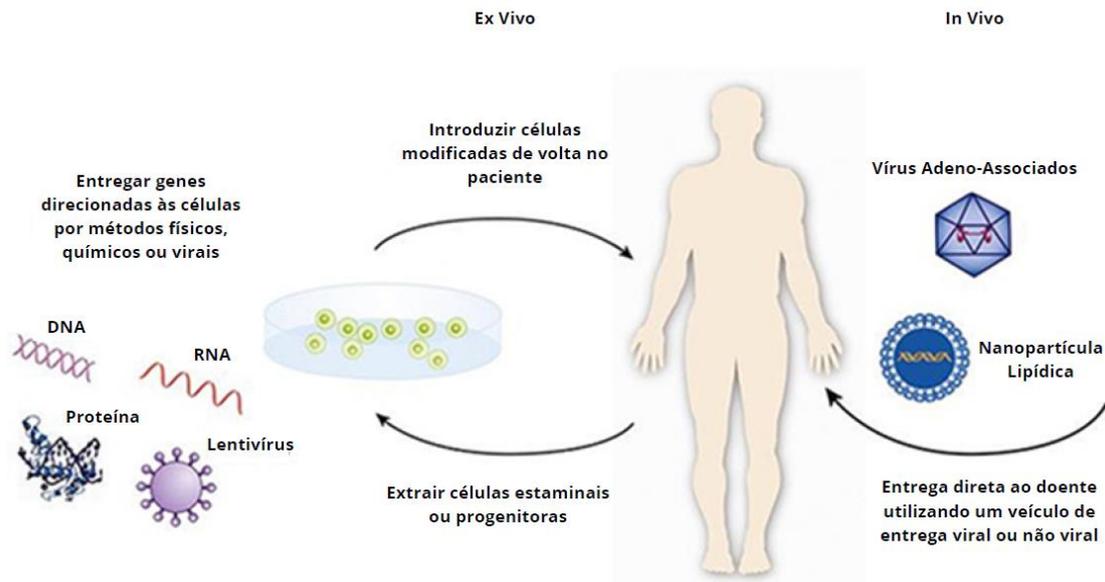


Figura 1.3 Metodologias de Administração de Terapias Gênicas. Adaptado de (25)

4.2.2 Vetores

Um dos principais problemas no que concerne às Terapias Gênicas é a necessidade de encontrar vetores capazes de realizar a entrega dos ácidos nucleicos ao núcleo celular, uma vez que o reduzido tamanho e a carga negativa do DNA, assim como a degradação mediada por nucleases, limitam o seu tempo de semi-vida e a sua eficácia terapêutica. Os vetores têm, por isso, o objetivo de facilitar a entrega dos transgenes, proteger os ácidos nucleicos da degradação, promover a internalização celular e ainda auxiliar a integração no núcleo (26, 27, 28).

Um vetor ideal deverá cumprir alguns requisitos que são imprescindíveis para que a terapia aconteça com a maior eficácia e segurança possível:

- a) Não desencadear resposta imunológica;
- b) Exibir um perfil de segurança elevado;
- c) Ter capacidade de transportar ácidos nucleicos independentemente do tamanho;
- d) Permitir a entrega específica, independentemente da localização das células alvo;
- e) Possuir a capacidade de infectar células mitóticas e não mitóticas;
- f) Permitir uma expressão regulada e sustentada dos genes transportados;

- g) Manter o transgene em posição episomal ou integrar-se numa região específica do genoma;
- h) Possuir capacidade de produção em larga escala a um custo relativamente baixo.

Os vetores podem ser divididos em dois grandes grupos: os vetores virais e os vetores não virais. Os vetores virais são os mais utilizados atualmente em ensaios clínicos de terapias génicas embora os vetores não virais já tenham evidenciado a sua importância no transporte de genes. A escolha é feita de acordo com a patologia, o tecido alvo, o tamanho e o tipo de gene de interesse, o tempo e os níveis de expressão que se pretende obter (27).

Os vetores não virais englobam dois tipos de abordagens: as físicas e as químicas. As abordagens físicas passam por métodos como a injeção direta, entrega hidrodinâmica, eletroporação, ultrassons, *gene gun* e ainda transfeção magnética, e atuam alterando a permeabilidade da membrana celular sendo utilizados maioritariamente para a introdução de plasmídeos que não têm necessidade de um transportador (Figura 1.4) (29, 30).

As abordagens químicas utilizadas incluem lipossomas catiónicos e polímeros catiónicos. Os lipossomas catiónicos são compostos por lípidos que formam complexos com o DNA facilitando a sua entrada na célula. Por outro lado, os polímeros catiónicos condensam o DNA, protegendo-o da degradação feita por nucleases (31).

Os sistemas não virais apresentam inúmeras vantagens como a sua alta reprodutibilidade, a possibilidade de produção em larga escala e baixo custo, a possibilidade de entrega de transgenes maiores e ainda apresentam um menor risco de respostas imunológicas ou de mutagénese por inserção. No entanto, estes sistemas ainda apresentam algumas desvantagens como a baixa eficiência de transdução e especificidade, a distribuição por vezes não específica e o baixo tempo de semi-vida na corrente sanguínea. No que diz respeito aos vetores não virais químicos, mais especificamente aos polímeros hidrofílicos, para combater estas desvantagens tem-se modificado a superfície dos lipossomas que os têm (26).

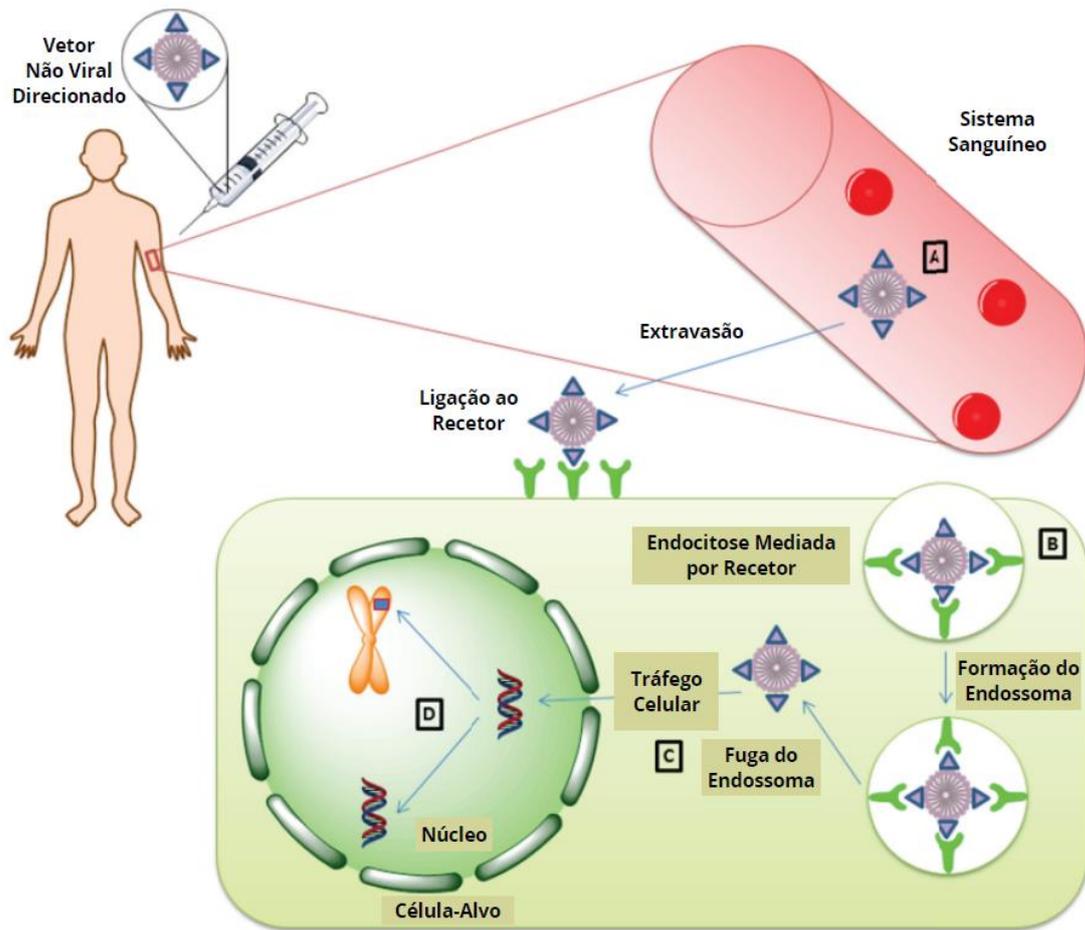


Figura 1.4 Mecanismo de ação dos vetores não virais na Terapia Génica.
Adaptado de (27)

Relativamente aos vetores virais, os vetores mais comuns incluem adenovírus, retrovírus e vírus adeno-associados, que são modificados com o objetivo de aumentar o seu perfil de segurança, impedindo a sua replicação e ciclo infeccioso. Os vírus são naturalmente eficientes no que concerne à transferência de material genético devido à sua alta taxa de infeção e transdução em células humanas. Apesar de terem estas vantagens, acabam por ser desvantajosos no que diz respeito à sua produção em larga escala, uma vez que é complexa e dispendiosa, ao risco de respostas imunológicas associadas à sua utilização e ao risco da ocorrência de recombinação viral (Figura 1.5) (27, 28).

Dos vetores virais mencionados, existem alguns que merecem especial atenção:

- Adenovírus – São capazes de infectar células mitóticas ou não mitóticas sem necessitarem de integração no genoma hospedeiro. No entanto, estão associados a alta resposta imunológica e a hepatotoxicidade (27).
- Retrovírus – Integram o DNA no genoma hospedeiro, permitindo a expressão estável do transgene. No entanto, apresentam risco de mutagênese por inserção (27).
- Vírus Adeno-Associados – São menos imunogênicos que os adenovírus e são capazes de mediar a expressão a longo prazo do transgene. No entanto, são bastante limitados devido à pequena capacidade de DNA que suportam (27).

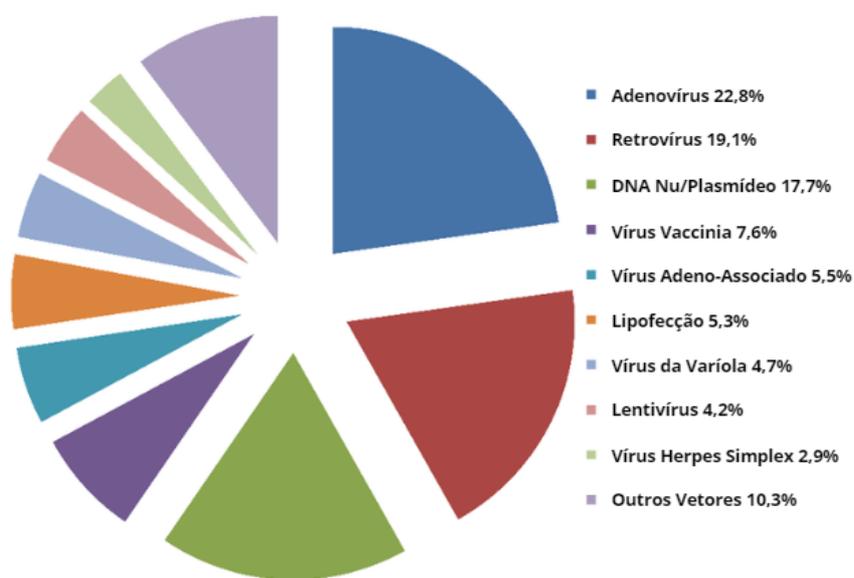


Figura 1.5 Vetores utilizados em ensaios clínicos para Terapias Gênicas.
Adaptado de (32)

4.2.3 Estratégias Terapêuticas

Na área das Terapias Gênicas, é fundamental a adequação das estratégias terapêuticas às patologias e vetores utilizados. Existem já estudadas várias opções: transferência de genes, silenciamento de genes e edição de genes (33).

No que diz respeito à transferência de genes, como o seu nome indica, é feita através da introdução ou substituição de material genético recombinante para corrigir genes defeituosos ou fornecer novas funções celulares. Esta estratégia pode ser realizada *in vivo* e *ex vivo*, metodologias já abordadas anteriormente.

O exemplo mais comum é a utilização do Glybera em pessoas com Deficiência de Lipoproteína Lipase, um vetor que é utilizado para entregar uma cópia funcional do gene *LPL* através de injeções intramusculares e que resulta na produção da enzima necessária para a degradação de gorduras (17, 34). Similarmente, para a Hemofilia B, a transferência do gene que codifica o fator IX de coagulação sanguínea tem demonstrado elevada eficácia clínica, apesar dos desafios relacionados com a resposta imune (35). Por outro lado, e como mencionado anteriormente, esta estratégia pode também melhorar ou introduzir novas funções celulares, como por exemplo tem sido feito na insuficiência cardíaca com a sobreexpressão do gene *SARCA2a*, que melhora o transporte de cálcio nas células musculares cardíacas (36).

Relativamente ao silenciamento de genes, esta estratégia recorre a vários métodos: RNA de interferência (iRNA), oligonucleótidos *antisense*, ribozimas e aptâmeros. Embora atuem através de mecanismos diferentes, têm todos o mesmo objetivo, impedir que o gene mutado responsável pela patologia produza a proteína alterada, prevenindo assim o fenótipo resultante (33).

A descoberta do RNA de interferência foi feita em 1998, por Fire e Mello, e é uma técnica que utiliza moléculas de RNA de cadeia dupla para desencadear a degradação do mRNA alvo ou inibir a tradução, prevenindo assim a síntese de proteínas associadas à doença. Existem várias moléculas utilizadas neste processo (shRNA, siRNA e miRNA) que funcionam ao serem incorporadas no RNA-*induced silencing complex* (RISC) e que clivam ou bloqueiam a tradução do mRNA alvo (37).

No que concerne aos oligonucleótidos *antisense* (ASOs), estes são pequenas cadeias de DNA ou RNA que se ligam ao mRNA alvo, formando um complexo que impede a tradução do mRNA ou ativa a degradação por RNase H. Esta técnica é utilizada em patologias como a Doença de Huntington uma vez que o silenciamento específico de alelos tem demonstrado melhorias significativas no fenótipo (38) (39).

Relativamente aos aptâmeros, estes são pequenas moléculas de RNA ou ssDNA que se ligam especificamente às proteínas alvo, inibindo a sua função. Ao serem altamente estáveis e não imunogénicos têm-se tornado numa estratégia cada vez mais promissora para as Terapias Génicas (40). As ribozimas são moléculas de RNA com atividade catalítica que conseguem clivar mRNAs específicos, reduzindo a expressão génica (41).

Por último, a edição de genes é uma estratégia terapêutica que permite corrigir alterações diretamente no DNA, substituindo ou adicionando genes para restaurar as funções habituais (42). Esta estratégia pode ser feita recorrendo a:

- Meganucleases – Endonucleases que reconhecem e clivam longas sequências específicas de DNA, promovendo a reparação do DNA por recombinação homóloga (43).
- Nucleases Dedos de Zinco (ZFN) – São proteínas projetadas para se ligarem a sequências específicas de DNA, onde induzem quebras na dupla hélice que são reparadas por mecanismos celulares, permitindo a edição do gene (44).
- TALENs – São similares às ZFNs mas utilizam domínios efetores TAL para se ligarem ao DNA, proporcionando uma maior especificidade e flexibilidade no reconhecimento de sequências alvo (45).
- CRISPR/Cas9 – É uma tecnologia revolucionária que utiliza um RNA-guia para direcionar a endonuclease Cas9 a sequências específicas de DNA, onde ela cliva a dupla hélice, o que permite a realização de edições precisas. Esta técnica tem sido altamente eficaz em diversas aplicações de edição genética devido à sua simplicidade e precisão (45, 46).

4.3 A Atualidade e o Futuro

Há vários anos que se estudam as Terapias Génicas e, agora que têm sido demonstrados alguns resultados, o estudo das mesmas tem aumentado exponencialmente. Com ele, vieram inúmeras terapias para várias doenças, nomeadamente para doenças raras. Na Tabela 1.1, encontram-se as terapias aprovadas pela EMA e pela FDA. No entanto, as Terapias Génicas e Celulares (junção de ambas as terapias numa só) com utilização de células CAR-T serão apresentadas na Tabela 1.3 desta Monografia.

Tabela 1.1 Terapias Gênicas aprovadas atualmente pela EMA e FDA

Nome da Terapia	Empresa	Resumo	Patologia	Custo	Ano de Aprovação
Zolgensma (onasemnogene abeparvovec) (47)	Novartis	Terapia para a atrofia muscular espinhal tipo 1, substituindo o gene <i>SMN1</i> defeituoso.	Atrofia Muscular Espinhal Tipo 1	\$2,1 milhões	2019 (FDA, EMA)
Luxturna (voretigene neparvovec) (48)	Spark Therapeutics	Terapia para distrofia retiniana hereditária, introduzindo uma cópia funcional do gene <i>RPE65</i> .	Distrofia Retiniana Hereditária	\$850.000	2017 (FDA), 2018 (EMA)
Hemgenix (etranacogene dezaparvovec) (49)	CSL Behring	Terapia para hemofilia B, introduzindo uma cópia funcional do gene <i>FIX</i> .	Hemofilia B	\$3,5 milhões	2022 (FDA), 2023 (EMA)
Roctavian (valoctocogene oxaparvovec) (50)	BioMarin	Terapia para hemofilia A, introduzindo uma cópia funcional do gene <i>F8</i> .	Hemofilia A	\$2,9 milhões	2022 (FDA), 2023 (EMA)
Skysona (elivaldogene autotemcel) (51)	Bluebird Bio	Terapia para adrenoleucodistrofia cerebral, introduzindo o gene <i>ABCD1</i> funcional.	Adrenoleucodistrofia Cerebral	Não divulgado	2021 (EMA)

Nome da Terapia	Empresa	Resumo	Patologia	Custo	Ano de Aprovação
Strimvelis (52)	Orchard Therapeutics	Terapia para imunodeficiência combinada grave por deficiência de ADA, introduzindo o gene ADA.	Imunodeficiência Combinada Grave (SCID)	Não divulgado	2016 (EMA)
Glybera (Alipogene tiparvovec) (53)	uniQure	Terapia para deficiência de lipoproteína lipase (LPL), introduzindo uma cópia funcional do gene LPL.	Deficiência de Lipoproteína Lipase	€1 milhão	2012 (EMA)
Libmeldy (atidarsagene autotemcel) (54)	Orchard Therapeutics	Terapia para leucodistrofia metacromática, introduzindo uma cópia funcional do gene ARSA.	Leucodistrofia Metacromática	Não divulgado	2020 (EMA)
Zynteglo (betibeglogene autotemcel) (55)	Bluebird Bio	Terapia para beta-talassemia dependente de transfusão, introduzindo uma cópia funcional do gene HBB.	Beta-Talassemia	€1,575 milhão	2019 (EMA)
Upstaza (eladocagene exuparvovec) (56)	PTC Therapeutics	Terapia para deficiência de AADC, introduzindo	Deficiência de eficiência da descarboxilase dos L-	Não divulgado	2022 (EMA)

Nome da Terapia	Empresa	Resumo	Patologia	Custo	Ano de Aprovação
		uma cópia funcional do gene <i>AADC</i> .	aminoácidos aromáticos (<i>AADC</i>)		
Imlygic (talimogene laherparepvec) (57)	Amgen	Terapia baseada em vírus oncolíticos para o tratamento de melanoma, utilizando um vírus modificado para matar células cancerígenas.	Melanoma	\$65.000	2015 (FDA), 2016 (EMA)
Beqvez (fidanacogene elaparvovec-dzkt) (58)	Pfizer	Terapia Génica para hemofilia B, introduzindo uma cópia funcional do gene <i>F9</i> para aumentar a produção do fator IX.	Hemofilia B	Não divulgado	2024

Embora existam cada vez mais terapias, como vimos anteriormente, 95% das doenças raras não têm terapias. No entanto, não são apenas estas que se encontram a ser estudadas: patologias como o cancro, diabetes e SIDA são estudadas arduamente para que se consigam arranjar terapêuticas para elas.

É sobretudo na descoberta de novas terapêuticas que se deve focar o futuro das Terapias Génicas, pois desde as metodologias de administração até aos vetores a utilizar e às estratégias terapêuticas possíveis, existe ainda um mundo por descobrir.

5 Terapias Celulares

5.1 Terapias Celulares e a sua Evolução

As Terapias Celulares consistem na transferência autóloga (células do próprio doente) ou alogénica (células de um dador) de células humanas para uma pessoa, com o objetivo de reparar ou substituir células, tecidos ou órgãos danificados. Estas terapias podem ser realizadas com células estaminais e não estaminais que, dependendo do tipo de célula em questão, poderão apresentar diferentes perfis imunofenotípicos, mecanismos de ação e técnicas de isolamento (59).

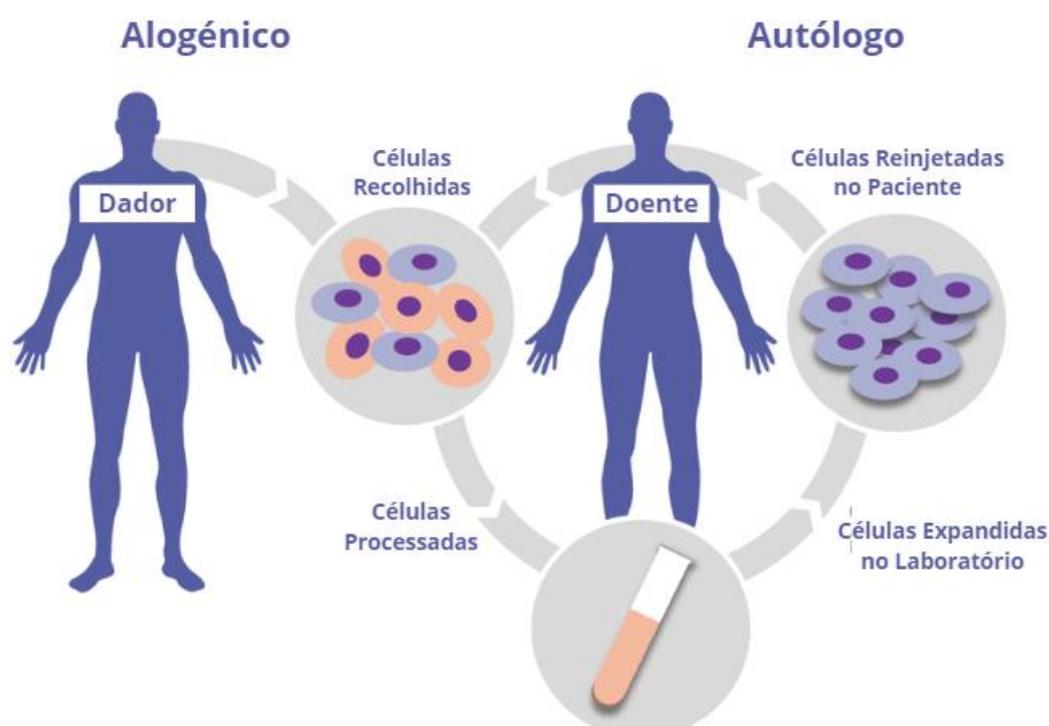


Figura 1.6 Terapias Celulares com células autólogas e alogénicas. Adaptado de (60)

Tendo por base o conhecimento já adquirido sobre estas terapias, sabemos que as mesmas podem ser unicelulares ou multicelulares, dependendo da quantidade de tipos de células que estão a ser utilizadas, podem recorrer a manipulações na formulação ou a engenharia genética e, por último, podem ser administradas por diferentes vias consoante a sua finalidade e alvo: intravenosa, intra-arterial, tópica, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral e intranasal (59, 61, 62).

A utilização de células alogênicas pode, por vezes, ser uma desvantagem neste tipo de terapias, uma vez que estas apresentam maior risco de rejeição devido ao reconhecimento das células do dador como células estranhas por parte do sistema imunitário do hospedeiro (62).

Os critérios de utilização das células nas determinadas terapêuticas são bastante rígidos, uma vez que o potencial de diferenciação tem de ser tido em conta. O potencial de diferenciação é a capacidade de uma célula gerar novas linhagens celulares. As células utilizadas em Terapia Celular podem ser classificadas, de acordo com este potencial, em totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes e unipotentes, por ordem crescente do grau de diferenciação (63, 64).

Os primórdios destas terapias iniciaram-se com injeções de material de origem animal para se tratarem doenças e retardar o envelhecimento, que não foram bem sucedidos. No entanto, os esforços para encontrar soluções utilizando estas terapias não pararam e, foi por isso, que se veio a descobrir que as células-tronco hematopoiéticas poderiam regenerar o sistema sanguíneo. Esta descoberta acabou por levar ao desenvolvimento do transplante de medula óssea, que se tornou crucial em doenças como leucemias e linfomas, uma vez que estas células têm a capacidade de se diferenciar e repovoar a medula óssea (63).

A descoberta das células-tronco embrionárias abriu um leque de possibilidades terapêuticas uma vez que estas células se conseguem diferenciar em qualquer tipo de célula. No entanto, a utilização destas células levou a regulamentações bastante rigorosas e ao aparecimento de elevadas questões éticas (63).

Contudo, a maior descoberta ao longo dos últimos anos prende-se nas células CAR-T, linfócitos T modificados geneticamente para reconhecer e atacar células cancerígenas, que têm demonstrado ter um elevado potencial terapêutico. Ao longo dos anos as terapias com estas células têm tido melhorias significativas na eficácia e segurança, tendo resultado na aprovação das mesmas em 2017 pela FDA. A utilização destas células tem sido um foco constante no que diz respeito à investigação de Terapias Celulares (63, 65, 66).

5.2 Células Terapêuticas, Terapias Unicelulares e Multicelulares e Estratégias de Implementação das Terapias

5.2.1 Células Terapêuticas

Tendo em conta os diferentes objetivos das terapias, as células utilizadas podem ser completamente díspares. Podemos ter células estaminais, células estaminais adultas e ainda células que já se encontram diferenciadas. Estas células têm funções e características distintas, sendo importante analisar e estudar quais as que devem ser utilizadas em cada situação (59).

As células estaminais são indiferenciadas ou não especializadas, têm elevada capacidade de autorrenovação e de diferenciação em diversas linhagens celulares. Estas células são fundamentais na regeneração de tecidos (59).

As células estaminais mais utilizadas nas Terapias Celulares são as pluripotentes, uma vez que se podem diferenciar em células das três camadas germinativas: endoderme, mesoderme e ectoderme. Estas células incluem:

- Células Estaminais Embrionárias – Derivam da massa celular interna do blastocisto antes da implantação no útero, apresentando propriedade de autorrenovação e estabilidade genómica (64, 67, 68).
- Células Estaminais do Epiblasto – Obtidas do epiblasto após implantação do blastocisto. Diferem das anteriores uma vez que não têm capacidade de formar um embrião completo quando injetadas num blastocisto hospedeiro (67, 69).
- Células Embrionárias Germinativas – Derivadas de células germinativas primordiais e encontradas em gónadas fetais (63).
- Células Estaminais Pluripotentes Induzidas – Reprogramadas a partir de células adultas utilizando fatores de transcrição específicos (70, 71).

Relativamente às células estaminais adultas, estas encontram-se em tecidos como a medula óssea, a pele e o SNC, e têm capacidade de autorrenovação e diferenciação embora esta seja menor que a das células estaminais embrionárias (63). Estas células são maioritariamente multipotentes e alguns exemplos são:

- Células Estaminais Hematopoiéticas – Responsáveis pela formação de todas as células sanguíneas (72).

- Células Estaminais da Pele – Importantes para a renovação contínua da epiderme (73, 74).
- Células Estaminais Neurais – Capazes de se diferenciar em neurónios e células gliais (75).
- Células Estaminais Mesenquimais – Têm capacidade de se diferenciar em diferentes tipos de células mesodérmicas: osteócitos, adipócitos, condrócitos, etc (76, 77).

As células diferenciadas são as células que já atingiram um estado específico de especialização funcional e estrutural, desempenhando funções específicas e definidas no organismo (59). Estas células têm origem nas células estaminais que passaram por várias fases de diferenciação, por exemplo:

- Fibroblastos – Células do tecido conjuntivo que são responsáveis pela síntese de colagénio e outros componentes da matriz extracelular (78, 79).
- Queratinócitos – São as principais células da epiderme e estão envolvidas na formação da barreira cutânea e no processo de cicatrização (80).
- Melanócitos – Encontram-se na epiderme e nos folículos pilosos e produzem melanina, protegendo a pele contra a radiação ultravioleta (81).
- Hepatócitos – São as principais células do parênquima hepático e desempenham funções metabólicas, de desintoxicação e síntese proteica (82, 83).
- Ilhéus Pancreáticos – Aglomerados de células do pâncreas que produzem insulina, glucagon e somatostatina e que são essenciais para a regulação da glicose sanguínea (84).
- Condrócitos – Células que constituem as cartilagens, são responsáveis pela produção de colagénio e pela matriz extracelular (85).
- Células Imunitárias:
 - Células T (Linfócitos T) – São cruciais para a imunidade celular uma vez que reconhecem antígenos estranhos e regulam outras células imunitárias (86).

- Células Dendríticas – Atuam como apresentadoras de antígenos, iniciando respostas imunes adaptativas (87, 88).
- Células Natural Killer – Participam na resposta imune inata, eliminando células tumorais e infectadas por vírus (89).
- Macrófagos – Derivam dos monócitos e são responsáveis pela fagocitose de organismos patogênicos e células mortas. Além disso, modulam respostas inflamatórias do organismo (90).

5.2.2 Terapias Unicelulares e Multicelulares

Como mencionado anteriormente, as Terapias Celulares podem ser unicelulares ou multicelulares. As terapias unicelulares utilizam apenas um tipo de células enquanto as terapias multicelulares utilizam vários tipos de células (59).

A ideia de que as terapias multicelulares são mais eficazes na promoção da reparação tecidual a longo prazo que as terapias unicelulares tem vindo a crescer. São inúmeros os estudos realizados neste sentido e que acabam por dar maior credibilidade a esta comparação. Acredita-se que o maior benefício das terapias multicelulares se prende pela heterogeneidade celular, que parece mimetizar características fisiológicas como a imunomodulação, a diferenciação celular e a angiogénese (59).

Alguns estudos têm evidenciado algumas características específicas das terapias multicelulares como, por exemplo, a comparação entre *cytokine-induced killer* e a combinação destas com células dendríticas que demonstrou que a combinação tinha efeitos antitumorais mais eficazes, uma vez que esta leva à coestimulação recíproca e constante entre as células e inicia reações imunitárias e mecanismos de lise tumoral (59).

Uma vez que ainda existem inúmeras questões relativamente a esta comparação e a esta área científica, atualmente, existem imensos estudos para tentar encontrar uma resposta científica comprovada.

5.2.3 Estratégias de Implementação das Terapias Celulares

Para que possam ser implementadas estas terapias, é necessário realizar algumas etapas cruciais, a colheita das células, a produção das células, a preservação das células

e ainda a administração das mesmas. Apesar de já serem bastante utilizados, estes processos encontram-se em constante atualização.

Relativamente às estratégias de colheita de células, estas exigem elevados níveis de recuperação e viabilidade celular, além de curtos períodos de processamento. A colheita das células pode ser automatizada, que tem como vantagem a sua integração com o processo de produção, ou manual, que por vezes acaba por ser mais adequada devido a alguns desafios sentidos na utilização do outro método (61).

O processo de produção varia consoante o tipo de células (autólogas e alogénicas). A produção deve ser preferencialmente feita de forma automatizada e fechada uma vez que isso diminui o risco de contaminação, tornando o processo mais seguro. A produção de terapias com células autólogas envolve as seguintes etapas:

1. Colheita das células do doente e transferência para o local de processamento – É nesta etapa que as populações de células relevantes são isoladas.
2. Ativação, modificação genética e expansão das células – É nesta etapa que se assegura a adaptação necessária para que as células adquiram os seus fins terapêuticos.
3. Pós-Processamento – Envolve a lavagem e purificação das células.
4. Recolha de amostras para controlo de qualidade – Etapa crucial para garantir a segurança e eficácia do produto final.
5. Expansão *in vitro* – É feita até se atingir a dose celular pretendida.
6. Acondicionamento e transferência do produto para o local de administração.

No que diz respeito à produção das terapias alogénicas, o processo é semelhante, mas não existe colheita de células do doente, as células são colhidas ao dador (61).

A preservação das células é uma etapa crucial do processo uma vez que permite o transporte entre locais de colheita, o processamento, a própria administração e ainda os testes necessários para a realização do controlo de qualidade e segurança. Este processo, além de maximizar o número de produtos celulares produzidos, permite a criação de bancos celulares que poderão ser utilizados para fins terapêuticos ou de investigação (91).

Por último, uma etapa imprescindível da implementação destas estratégias é a administração das células, que depende do tecido ou órgão alvo. A administração pode ser:

- Local – Injeções em locais específicos (intraperitoneais, intramusculares ou intracardíacas).
- Sistêmica – Incluem as injeções intravenosas, as mais utilizadas, e as intra-arteriais.

As estratégias de administração são escolhidas com base na especificidade do tratamento necessário e na localização do alvo terapêutico. A escolha da via de administração adequada é fundamental para maximizar a eficácia do tratamento e minimizar os riscos de complicações (92).

Embora já sejam bastante utilizados, estes processos encontram-se em constante atualização uma vez que as estratégias de implementação de terapias são alvo recorrente de estudos.

5.3 A Atualidade e o Futuro

As Terapias Celulares têm vindo a ser estudadas ao longo dos últimos anos, uma vez que as mesmas demonstram cada vez mais ter um potencial infindável no que diz respeito à descoberta de novas terapias para doenças sem tratamento eficaz, nomeadamente as doenças raras.

Atualmente, existem inúmeras Terapias Celulares aprovadas, sendo que diferem bastante no tipo de células que utilizam. Assim sendo, é possível percebermos que todos os parâmetros falados anteriormente acabam por ser fundamentais nestas terapias, caracterizando-as.

Tabela 1.2 Exemplo de uma Terapia Celular aprovada pela FDA que utiliza uma das estratégias mencionadas

Nome da Terapia	Empresa	Resumo	Patologia	Custo	Ano de Aprovação
Lantidra (donislecel) (93)	CellTrans	Terapia celular para transplante de ilhéus pancreáticos para doentes com diabetes tipo 1 de difícil controlo.	Diabetes Tipo 1 de difícil controlo	Não divulgado	2023 (FDA)

Enfatizam-se nesta Monografia áreas importantes no que diz respeito à Medicina Personalizada, incluindo as principais patologias do mundo sem terapêutica eficaz. Entre estas podemos encontrar o cancro, a diabetes, a SIDA e algumas doenças raras (Tabela 1.2).

A principal área de foco nas Terapias Celulares da atualidade tem sido as CAR-T, uma vez que estas têm apresentado excelentes resultados relativamente às terapias para o cancro, que é provavelmente a maior área de investigação e estudo na atualidade.

Tabela 1.3 Terapias Celulares com CAR-T aprovadas pela EMA e FDA

Nome da Terapia	Empresa	Resumo	Patologia	Custo	Ano de Aprovação
Kymriah (tisagenlecleucel) (94)	Novartis	Terapia CAR-T para leucemia linfoblástica aguda (LLA) e linfoma difuso de grandes células B (DLBCL).	Leucemia Linfoblástica Aguda e Linfoma Difuso de Grandes Células B	\$475.000	2017 (FDA), 2018 (EMA)

Nome da Terapia	Empresa	Resumo	Patologia	Custo	Ano de Aprovação
Yescarta (axicabtagene ciloleucel) (95)	Kite Pharma (Gilead Sciences)	Terapia CAR-T para linfoma de células B grandes recidivante ou refratário.	Linfoma de Células B Grandes	\$373.000	2017 (FDA), 2018 (EMA)
Abecma (idecabtagene vicleucel) (96)	Bristol-Myers Squibb	Terapia CAR-T para mieloma múltiplo recidivante ou refratário.	Mieloma Múltiplo	\$419.500	2021 (FDA), 2021 (EMA)
Breyanzi (lisocabtagene maraleucel) (97, 98, 99)	Bristol-Myers Squibb	Terapia CAR-T para linfoma de grandes células B e linfoma de células do manto, usando células T modificadas geneticamente.	Linfoma de Grandes Células B (2021), Linfoma de Células do Manto (2024)	Não divulgado	2021 (FDA)
Tecartus (brexucabtagene autoleucel) (100)	Kite Pharma (Gilead Sciences)	Terapia CAR-T direcionada ao CD19 para o tratamento de doentes com linfoma de células do manto.	Linfoma de Células do Manto	\$373.000	2020 (FDA)
Provenge (sipuleucel-T) (101)	Dendreon	Imunoterapia autóloga para o cancro da próstata metastático, utilizando células imunes.	Cancro da Próstata Metastático	\$93.000 (por curso)	2010 (FDA)

Como é possível observar pelos exemplos apresentados na Tabela 1.3, as Terapias Celulares têm ganho cada vez mais impacto na área da Saúde e os exemplos apresentados reforçam o impacto que estas terapias têm tido na resposta a diversas neoplasias. Já se começam a observar algumas terapias de conjugação entre as Terapias Génicas e as Terapias Celulares, demonstrando uma aposta bastante elevada na inovação.

Embora existam já inúmeras terapias aprovadas pela EMA e pela FDA, a verdade é que ainda são insuficientes para o número de doenças raras e patologias sem terapêutica até ao momento. É, por isso, imprescindível que a investigação sobre o custo/benefício e o investimento na inovação continuem, uma vez que têm trazido qualidade de vida e esperança a alguns doentes.

O futuro das Terapias Celulares deve-se focar na descoberta de novos tratamentos e melhoria dos já existentes, desde a quantidade de células a utilizar, ao seu tipo e aos vários passos para a implementação destas terapias.

6 Farmacêuticos e os Desafios na Medicina Personalizada

Os Farmacêuticos são os Profissionais de Saúde com uma área de atuação mais ampla no que diz respeito à Ciência e à Saúde, uma vez que acabam por estar ligados a várias áreas desde a Bioquímica, à Farmacologia e à Fisiologia, entre outras.

É devido então à sua ampla área de atuação que podemos considerar que, consoante a área que desempenham no dia a dia, os Farmacêuticos encontram inúmeros desafios e oportunidades relacionadas com a Medicina Personalizada.

A Medicina Personalizada tem sido fulcral para a otimização dos processos relacionados com a Saúde. No entanto, algumas das suas áreas, como as Terapias Génicas e Celulares, encontram diariamente alguns problemas preocupantes. A não existência de equidade no acesso às mesmas, a baixa sustentabilidade associada a estas terapias e o desconhecimento sobre o futuro relativamente a possíveis efeitos adversos ou à sua eficácia são alguns dos principais problemas que devem ser enfrentados pelas autoridades competentes, das quais fazem parte Farmacêuticos.

Considero que as áreas que enfrentam maiores desafios são então a Investigação, Ensaio Clínico, Análises Clínicas, Indústria Farmacêutica, Farmácia Hospitalar e Assuntos Regulamentares. No entanto, nas áreas como a Farmácia Comunitária e a Consultoria também se devem manter atualizadas sobre o tema.

6.1 Investigação e os seus Desafios

A área da Investigação é uma área que se encontra em constante atualização e com desafios que devem ser aprofundados e solucionados. Existem focos de estudo prioritários ou com maior ênfase na atualidade, fazendo parte deles as Terapias Génicas e Celulares.

Os Farmacêuticos, com diversas especializações, são fulcrais nestes estudos e têm vários desafios para enfrentar diariamente. Uma vez que estas terapias têm tido um elevado sucesso e eficácia, espera-se que nos próximos anos sejam infindáveis os estudos sobre estas terapêuticas. No entanto, estes estudos não se prendem apenas na descoberta e inovação farmacológica ou genética para a criação de novas terapias,

prendem-se nos estudos das mais variadas etapas da criação, administração, conservação e até mesmo monitorização das mesmas.

Desde a descoberta de vetores, aos métodos de administração e preservação, os Farmacêuticos têm elevados desafios no que diz respeito à Medicina Personalizada, já para não falar do aumento das terapias combinadas que acabam por ser pensadas e criadas de acordo com descobertas feitas por vários cientistas, nomeadamente Farmacêuticos, relativamente a pormenores importantes das patologias em estudo.

Em vários países, existe um envolvimento cada vez maior dos Farmacêuticos no que diz respeito a determinados estudos uma vez que os seus conhecimentos sobre várias áreas, ajudam na compreensão e realização dos mesmos. Nos Estados Unidos da América, os Farmacêuticos têm sido incluídos cada vez mais em estudos de Farmacogenómica numa vertente mais clínica uma vez que os seus conhecimentos de farmacologia e genómica acabam por ser fulcrais para uma otimização dos mesmos (102).

Relativamente às Terapias Génicas, a genética é uma área ainda com muito para explorar e, por isso, em Portugal, existem também vários institutos e faculdades focadas nesta investigação, nomeadamente o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (4).

Além dos desafios de estudo e investigação, esta área enfrenta desafios de financiamento bastante complicados e que necessitam de ser justificados através de resultados obtidos. É por isso um desafio nesta área a obtenção de resultados positivos para que continuem a existir verbas disponíveis para que se possam realizar novos e inúmeros estudos.

6.2 Ensaio Clínicos e Análises Clínicas e os seus Desafios

Embora sejam compostas por Farmacêuticos especializados em áreas diferentes, as Análises Clínicas e os Ensaio Clínicos acabam por ter desafios bastante similares no que diz respeito à Medicina Personalizada. Nestes prendem-se, principalmente, a análise dos parâmetros bioquímicos dos doentes e o conhecimento das características associadas a uma determinada patologia.

É fulcral em ambas as áreas ter um profundo conhecimento dos biomarcadores específicos usados na monitorização de determinadas patologias para que se possa fazer uma análise crítica e objetiva aos valores que temos à frente no nosso dia a dia. É também importante manter-se uma constante atualização científica nestas áreas acompanhando os avanços científico-tecnológicos da realização de uma Terapia Génica ou Celular, que acabam por ser fundamentais no desempenho das suas funções. Estes desafios são fundamentais para o exercer da Profissão Farmacêutica, uma vez que sem esta atualização os Farmacêuticos não podem ser críticos e identificar possíveis lacunas que devem ser imediatamente comunicadas às pessoas ou às instituições.

Relativamente ao Ensaio Clínico, existem ainda alguns desafios extra uma vez que os Farmacêuticos têm mais etapas na sua realização que apenas a análise de dados. Estes desafios dizem respeito às vias e formas de administração dos medicamentos, que por vezes é feita pelos Farmacêuticos, e que pode ser feita de formas bastante diferentes, e à gestão e coordenação dos produtos dos Ensaio Clínico, que ao serem todos diferentes têm condições de armazenamento e utilização diferentes, que devem ser cumpridas, o que leva a uma constante aprendizagem e necessidade de atualização. Outro desafio que deverá ser lançado aos Farmacêuticos é a sua incorporação como *Study Coordinators*, para que passem a liderar Ensaio Clínico com os Médicos.

Estes desafios acabam por ser bastante interessantes no que diz respeito à Profissão Farmacêutica uma vez que nos permitem manter uma constante atualização literária, que é fundamental, e uma enorme vontade de querer sempre mais e melhor, valorizando a profissão.

6.3 Indústria Farmacêutica e os seus Desafios

As empresas da Indústria Farmacêutica têm uma elevada importância no que diz respeito às Terapias Génicas e Celulares, uma vez que estas é que incentivam o seu estudo e aparecimento no mercado. No entanto, para que isso aconteça, são necessários vários passos para que a implementação de determinada terapia não prejudique a empresa que a lança.

Estas terapias têm sido cada vez mais o foco de investimento destas empresas uma vez que ajudam no combate a doenças raras ou presentes em grande escala no mundo e sem tratamento. No entanto, os custos associados à investigação são bastante

elevados, resultando num preço exorbitante da terapia, o que tem sido um entrave e desafio à sua utilização (7, 103).

No que diz respeito às equipas multidisciplinares existentes nestas empresas, as áreas com os maiores desafios deverão ser *Medical Affairs*, *Market Access* e ainda a área de Investigação e Desenvolvimento. Relativamente à área de Investigação e Desenvolvimento, os desafios para os Farmacêuticos passam pelos desafios abordados anteriormente no subcapítulo da Investigação com a preocupação acrescida da necessidade de não existir um gasto exagerado de dinheiro durante o estudo e desenvolvimento destas terapias.

Relativamente à área de *Medical Affairs*, esta deverá ser a mais importante na implementação destas terapias uma vez que se foca na formação e no dar a conhecer aos Médicos as mesmas. Este deverá ser então o principal desafio dos Farmacêuticos, uma vez que para além de terem de formar inúmeros Médicos sobre as terapias existentes, ainda têm que lhes demonstrar em que situações deverão ser escolhidas determinadas terapêuticas em detrimento de outras para a mesma patologia, isto sabendo desde já que os Médicos, principalmente em Portugal, são bastante conservadores no que concerne à utilização de terapêuticas.

Market Access acaba por ser a última área a entrar no panorama, mas uma das mais fulcrais, uma vez que é através dela que são apresentados os dossiers da terapia às entidades reguladoras e, posteriormente, é por ela que é feita a negociação da comparticipação com as entidades responsáveis. Como é expectável, esta área encontra-se então cheia de desafios para os Farmacêuticos, não só no que diz respeito à regulamentação de terapias que envolvem a genética e que eticamente são bastante vulneráveis, como com os desafios encontrados nas negociações de quem assume os custos, entre as entidades detentoras da patente e as entidades regulamentares estatais, para benefício na prestação de cuidados de Saúde.

Embora por vezes a negociação dos valores seja complicada, atualmente o Infarmed já se encontra a realizar programas diferentes para a comparticipação de terapias como as Terapias Génicas e Celulares, como se conseguiu concluir com a entrevista dada pela Professora Doutora Ana Paula Martins, na altura Presidente do Conselho de Administração do Hospital de Santa Maria, em que a mesma explicou que o pagamento destes tratamentos está a ser feito por tranches: uma inicial e depois três

ao longo do tempo de acordo com o cumprimento dos objetivos clínicos definidos para que o pagamento de cada uma das tranches restantes seja feito. Caso não se obtenha o resultado pretendido numa das etapas, a comparticipação deixa de ser realizada e a empresa responsável pela terapia acarreta os custos (104). No entanto, o esforço para que cada vez mais pessoas tenham um acesso facilitado a este tipo de terapias deve ser feito por ambos os lados, as empresas e o Infarmed, e deve ser impulsionado pelos Farmacêuticos que devem demonstrar que a qualidade de vida obtida por uma pessoa ao utilizar estas terapias não pode ser impedida de se obter apenas por valores monetários.

6.4 Farmácia Hospitalar e os seus Desafios

Relativamente aos Farmacêuticos Hospitalares, os seus desafios passam por ser semelhantes aos Farmacêuticos das Análises Clínicas e Ensaio Clínicos, mas com objetivos finais completamente distintos.

Os Farmacêuticos Hospitalares são fulcrais desde o início da terapia até ao final: são responsáveis pela utilização da medicação caso pertençam à Comissão de Farmácia e Terapêutica (CFT) do seu hospital, são responsáveis pelo controlo da medicação, podem ser responsáveis pela administração e são responsáveis pela monitorização pós-terapêutica do doente.

Como é expectável com tantas tarefas associadas, os Farmacêuticos enfrentam então vários desafios nesta área. No que concerne ao controlo da medicação, à administração e à monitorização pós-terapêutica, os Farmacêuticos têm o desafio de se manter sempre atualizados no que diz respeito à respetiva literatura, uma vez que esta se encontra em constante alteração e os mesmos têm de estar sempre contextualizados de todos os cenários que poderão ter à frente no seu dia a dia no hospital.

Os Farmacêuticos que pertencem às CFTs têm de ter um conhecimento bastante detalhado sobre as terapêuticas existentes para as patologias existentes, uma vez que são eles que terão de demonstrar em CFT que a Terapia Génica ou Celular é mais vantajosa para determinado doente em comparação com as outras terapias existentes (105). Este acaba por ser um desafio bastante complicado porque não só têm de estar constantemente atualizados como têm de saber analisar os perfis dos doentes e explicar aos restantes membros da Comissão, principalmente aos Médicos mais conservadores,

que estas terapias são as mais benéficas para os doentes e que lhes trarão melhor qualidade de vida.

Posteriormente à autorização de utilização pela CFT, os Farmacêuticos ainda têm de realizar a Autorização de Utilização Excepcional (AUE) caso seja necessário, tendo de ter conhecimento se a terapia se encontra no Programa de Apoio Precoce (PAP) ou não, como acontece por exemplo com a Kymriah e a Yescarta, o que acaba por ser um desafio para os mesmos porque a utilização da terapia em determinado doente só será aprovada oficialmente consoante a justificação enunciada na AUE (106, 107).

6.5 Assuntos Regulamentares e os seus Desafios

A existência de novas terapias e inovações na área da Saúde, principalmente após a pandemia de COVID-19, tem levado a que existam cada vez mais alterações no que diz respeito aos Assuntos Regulamentares. Devido aos avanços científicos, à rapidez dos mesmos e à colaboração entre os vários países para otimizar os processos quer clínicos quer regulamentares, o Parlamento Europeu analisou tudo o que aconteceu ao longo dos últimos anos com o objetivo de otimizar os processos. Após esta análise, publicou em dezembro de 2021 o Regulamento (UE) 2021/2282 relativo à Avaliação das Tecnologias da Saúde, que altera a Diretiva 2011/24/UE, e que compreende no mesmo várias medidas para que a avaliação e aprovação destas tecnologias seja centralizada e feita por parte das atuais entidades reguladoras com alguns *inputs* de peritos externos e outras organizações a níveis mais estratégicos (108). É principalmente nesta vertente que os Farmacêuticos vão cada vez mais encontrar desafios nesta área, uma vez que vão ter de trabalhar de uma maneira completamente nova, com todas as contrariedades que isso exige, e que se terão de atualizar muito mais rapidamente que o habitual porque esta otimização de processos irá levar a que a aprovação das terapias seja mais rápida e eficaz.

Por outro lado, os Farmacêuticos que trabalham nos Assuntos Regulamentares também terão a sua tarefa mais dificultada, encontrando mais desafios, porque internamente dentro das suas empresas existirão cada vez mais atualizações a fazer e processos regulamentares alterados, necessitando de uma constante revisão, análise e, sobretudo, confirmação de que estão congruentes com as normas a seguir.

7 Perspetivas Futuras

As Terapias Génicas e Celulares estão cada vez mais a ser estudadas, sendo o futuro da área da Saúde. No entanto, existe ainda um longo caminho para percorrer, uma vez que ainda existem inúmeras doenças no mundo sem tratamento e em muitas delas o tratamento exigirá uma abordagem distinta.

O futuro desta área prende-se na combinação das várias terapias e no estudo e aperfeiçoamento dos diferentes aspetos que foram falados ao longo de toda a Monografia. Para isto, é necessário existir um investimento e um risco partilhado entre as empresas privadas e as próprias organizações governamentais, uma vez que o trabalho de todos será em prol de um objetivo comum: a melhor qualidade de vida do maior número de pessoas no mundo.

Doenças como a diabetes, o cancro e a SIDA serão provavelmente o foco destas terapias e, tendo em conta que têm sido obtidos resultados bastante positivos, é expectável que aumentem e que tenhamos cada vez mais terapêuticas para patologias que ainda não as tinham. No entanto, isto só será possível se existir um trabalho conjunto entre organizações de vários países para uma negociação conjunta com a indústria.

Em Portugal, o caminho a ser traçado para o aperfeiçoamento destas terapias já começou a ser feito e tem em vista a obtenção de resultados bastante positivos, uma vez que junta a academia, à clínica e à indústria. O GeneT, inaugurado no dia 2 de fevereiro de 2024, é o primeiro centro de investigação dedicado à Terapia Génica em Portugal, situado na Universidade de Coimbra e que terá a coordenação do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida. Este projeto terá financiamento por parte da Comissão Europeia e do Governo Português e irá colaborar com o *Gene Therapy Innovation and Manufacturing Centre*, da Universidade de Sheffield (Reino Unido), e com o *Finish National Virus Vector Laboratory*, da Universidade da Finlândia Oriental, instituições pioneiras no desenvolvimento de Terapias Génicas. Uma vez que o centro terá capacidade para realizar investigação, ensaios clínicos e produzir medicamentos, espera-se que no futuro tenha um elevado impacto para a Saúde Pública de Portugal (109). Ao ter um líder Farmacêutico, esta iniciativa valoriza e impulsiona a Profissão Farmacêutica para outros patamares, levando a que os Farmacêuticos se desafiem e lutem cada vez mais pelos seus objetivos.

O futuro é risonho para os Farmacêuticos com tantas áreas por explorar e com tanta necessidade de pessoas tão multidisciplinares como eles. Serão certamente um fator importante na evolução destas terapias e devem cada vez mais lutar pela sua valorização. A Profissão Farmacêutica tem atualmente uma oportunidade de evolução e de valorização da mesma, junto da comunidade mundial, que deverá ser aproveitada ao máximo pelos Farmacêuticos nos próximos anos.

8 Conclusões

A Medicina Personalizada tem revolucionado a área da Saúde nas mais variadas vertentes, principalmente no que diz respeito às Terapias Génicas e às Terapias Celulares. Isto acontece não só pelos seus resultados bastante positivos e esperançosos, mas também pela sua elevada complexidade, que acaba por necessitar de estudos nas mais variadas áreas, desde a procura de vetores à administração das terapias em si, para fundamentar e otimizar a sua utilização.

Os Farmacêuticos, multidisciplinares em termos de conhecimentos e de áreas de trabalho, são fundamentais no acesso a este tipo de terapias, uma vez que a sua ampla área de atuação leva a uma otimização dos processos e a um rendimento bastante acima da média. No entanto, os Farmacêuticos acabam por encontrar na Medicina Personalizada um elevado número de desafios, que os fazem crescer para que consigam cada vez mais proporcionar uma melhor qualidade de vida às pessoas.

Os Farmacêuticos deverão ser responsáveis pela descoberta de novas terapias através da investigação de novos vetores e mecanismos, deverão ter um largo conhecimento no que diz respeito às terapêuticas existentes para as mais variadas patologias para que as possam comparar e identificar qual deverá ser utilizada em determinado doente e situação, deverão ter uma enorme presença nos processos regulamentares para a aprovação destas terapêuticas e deverão estar dentro das negociações para o financiamento deste tipo de terapias, uma vez que os seus conhecimentos sobre o tratamento e a sua eficácia poderão ser cruciais para uma melhor interpretação do valor que estamos a dar ou não à obtenção de uma melhor qualidade de vida de uma determinada pessoa.

Os Farmacêuticos devem cada vez mais lutar pelo seu lugar de prestígio e pela valorização da sua profissão aos olhos da comunidade mundial, uma vez que estes são imprescindíveis para os avanços na Ciência e na Saúde.

A Medicina Personalizada é o presente e será o futuro da área da Saúde e os Farmacêuticos deverão ser os impulsionadores e líderes para que a mesma tenha um impacto inigualável no que concerne às patologias raras e sem resolução até à data.

Referências Bibliográficas

1. Making History with the 1990 Gene Therapy Trial [Internet]. [cited 2024 Jun 6]. Available from: <https://www.genengnews.com/insights/making-history-with-the-1990-gene-therapy-trial/>
2. Hartl DL. Essential genetics : a genomics perspective. 2011 [cited 2024 Jun 7];575. Available from: https://books.google.com/books/about/Essential_Genetics.html?hl=pt-PT&id=bhFubwD1JkC
3. RARE Disease Facts - Global Genes [Internet]. [cited 2024 Jun 7]. Available from: <https://globalgenes.org/rare-disease-facts/>
4. Genética Humana Categoria - INSA [Internet]. [cited 2024 Jun 10]. Available from: <https://www.insa.min-saude.pt/category/areas-de-atuacao/genetica-humana/>
5. Gonçalves GAR, Paiva R de MA. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. Vol. 15, Einstein (Sao Paulo, Brazil). 2017. p. 369–75.
6. What is gene therapy?: MedlinePlus Genetics [Internet]. [cited 2024 Jun 7]. Available from: <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/therapy/genetherapy/>
7. A Pfizer e os avanços pioneiros na terapia genética | Pfizer Portugal | Pfizer Portugal [Internet]. [cited 2024 Jun 7]. Available from: <https://www.pfizer.pt/a-nossa-ciencia/areas-de-investigacao-prioritarias/terapia-genetica/pfizer-e-os-avancos-pioneiros-na-terapia-genetica>
8. Zinder ND, Lederberg J. GENETIC EXCHANGE IN SALMONELLA. J Bacteriol. 1952 Nov; 64(5): 679–699.
9. Elizabeth Hunter Szybalska B, Szybalski W. GENETICS OF HUMAN CELL LINES, IV. DNA-MEDIATED HERITABLE TRANSFORMATION OF A BIOCHEMICAL TRAIT. Vol. 36, Biochem. Biophys. Res. Comm. 1908.
10. Humphries EH, Temin HM. Cell Cycle-Dependent Activation of Rous Sarcoma Virus-Infected Stationary Chicken Cells: Avian Leukosis Virus Group-Specific

- Antigens and Ribonucleic Acid. JOURNAL OF VIROLOGY. 1972. Jul; 10(1):82-87.
11. Programa Nacional de Diagnóstico Precoce [Internet]. [cited 2024 Jun 7]. Available from: <https://www.diagnosticoprecoce.org/doencas/Hiperargininemia.htm>
 12. Kohn DB. Historical Perspective on the Current Renaissance for Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy. Vol. 31, Hematology/Oncology Clinics of North America. W.B. Saunders; 2017. p. 721–35.
 13. N. D. Zinder and J. Lederberg, “Genetic Exchange in Salmonella,” J Bacteriol. 1952 Nov; 64(5): 679–699.
 14. Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S. History of gene therapy. Gene. 2013 Aug 10;525(2):162–9.
 15. Uddin F, Rudin CM, Sen T. CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future. Vol. 10, Frontiers in Oncology. Frontiers Media S.A.; 2020 Aug 7;10:1387.
 16. Zhang WW, Li L, Li D, Liu J, Li X, Li W, et al. The First Approved Gene Therapy Product for Cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 Years in the Clinic. Hum Gene Ther. 2018 Feb 1;29(2):160–79.
 17. CHMP. Glybera, INN - alipogene tiparvovec [Internet]. Available from: www.ema.europa.eu/contact
 18. CHMP. Public statement on Glybera: Expiry of the marketing authorisation in the European Union [Internet]. 2017. Available from: www.ema.europa.eu/contact
 19. Arjmand B, Larijani B, Sheikh Hosseini M, Payab M, Gilany K, Goodarzi P, et al. The horizon of gene therapy in modern medicine: Advances and challenges. In: Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer; 2020;1247:33-64.
 20. Canver MC. Evaluation of the Clinical Success of Ex Vivo and In Vivo Gene Therapy. J Young Investig [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2024 Jun 7]; Available from: <https://www.jyi.org/2009-january/2017/10/2/evaluation-of-the-clinical-success-of-ex-vivo-and-in-vivo-gene-therapy>

21. CHMP. Kymriah; INN-tisagenlecleucel [Internet]. Available from: www.ema.europa.eu/contact
22. CHMP. Zalmoxis, common name: Allogeneic T cells genetically modified with a retroviral vector encoding for a truncated form of the human low affinity nerve growth factor receptor (Δ LNGFR) and the herpes simplex I virus thymidine kinase (HSV-TK Mut2) [Internet]. Available from: www.ema.europa.eu/contact
23. Wilson RC, Gilbert LA. The Promise and Challenge of in Vivo Delivery for Genome Therapeutics. *ACS Chem Biol*. 2018 Feb 16;13(2):376–82.
24. Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems. Vol. 459, *International Journal of Pharmaceutics*. 2014. p. 70–83.
25. What is Gene Therapy? | FDA [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/what-gene-therapy>
26. Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems. Vol. 459, *International Journal of Pharmaceutics*. 2014. p. 70–83.
27. Chira S, Jackson CS, Oprea I, Ozturk F, Pepper MS, Diaconu I, et al. Oncotarget 2015 Oct 13;6(31):30675-703: www.impactjournals.com/oncotarget Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors [Internet]. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget/
28. Yang J, Liu H, Zhang X. Design, preparation and application of nucleic acid delivery carriers. Vol. 32, *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc.; 2014. p. 804–17.
29. Kamimura K, Suda T, Zhang G, Liu D. Advances in gene delivery systems. Vol. 25, *Pharmaceutical Medicine*. Springer International Publishing; 2011. p. 293–306.
30. Najmul Hasan et al./Gene therapy: Current status and future perspectives *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)* ,Vol 5 No 09 Sep 2014,586-593.
31. Tros de Ilarduya C, Sun Y, Düzgüneş N. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. Vol. 40, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010. p. 159–70.

32. Villate-Beitia I, Puras G, Zarate J, Agirre M, Ojeda E, Pedraz JL. First Insights into Non-invasive Administration Routes for Non-viral Gene Therapy. In: Gene Therapy - Principles and Challenges. InTech; 2015.
33. Wang D, Gao G. State-of-the-art human gene therapy: part II. Gene therapy strategies and clinical applications. *Discov Med*. 2014 Sep;18(98):151-61.
34. Gaudet D, Méthot J, Kastelein J. Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. Vol. 23, *Current Opinion in Lipidology*. 2012. p. 310–20.
35. High KH, Nathwani A, Spencer T, Lillicrap D. Current status of haemophilia gene therapy. Vol. 20, *Haemophilia*. Blackwell Publishing Ltd; 2014. p. 43–9.
36. Sleeper MM. Status of Therapeutic Gene Transfer to Treat Cardiovascular Disease in Dogs and Cats. Vol. 47, *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. W.B. Saunders; 2017. p. 1113–21.
37. Deng Y, Wang CC, Choy KW, Du Q, Chen J, Wang Q, et al. Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: Principles, challenges, and new strategies. Vol. 538, *Gene*. 2014. p. 217–27.
38. Chan JH, Lim S, Fred Wong W. ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: FROM DESIGN TO THERAPEUTIC APPLICATION [Internet]. Vol. 33, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2006 May-Jun;33(5-6):533-40. Available from: <http://sfold.wardsworth.org/index.pl>
39. Aguiar S, van der Gaag B, Cortese FAB. RNAi mechanisms in Huntington's disease therapy: SiRNA versus shRNA. Vol. 6, *Translational Neurodegeneration*. BioMed Central Ltd.; 2017.
40. Nimjee SM, White RR, Becker RC, Sullenger BA. Aptamers as Therapeutics. Vol. 57, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Annual Reviews Inc.; 2017. p. 61–79.
41. Couture, L. A., & Stinchcomb, D. T. (1996). Anti-gene therapy: the use of ribozymes to inhibit gene function. *Trends in Genetics*, 12(12), 510–515. doi:10.1016/s0168-9525(97)81398-4.
42. Maeder ML, Gersbach CA. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. Vol. 24, *Molecular Therapy*. Nature Publishing Group; 2016. p. 430–46.

43. Silva G, Poirot L, Galetto R, Smith J, Montoya G, Duchateau P, et al. Meganucleases and Other Tools for Targeted Genome Engineering: Perspectives and Challenges for Gene Therapy. 2011.
44. Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*. 2011 Aug;188(4):773–82.
45. Bi H, Yang B. Gene Editing With TALEN and CRISPR/Cas in Rice. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier B.V.; 2017. p. 81–98.
46. Doetschman T, Georgieva T. Gene Editing with CRISPR/Cas9 RNA-Directed Nuclease. Vol. 120, *Circulation Research*. Lippincott Williams and Wilkins; 2017. p. 876–94.
47. Zolgensma | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zolgensma>
48. Luxturna | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/luxturna>
49. U.S. Food and Drug Administration approves CSL’s HEMGENIX® (etranacogene dezaparvovec-drlb), the first gene therapy for hemophilia B - Nov 22, 2022 [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: <https://newsroom.csl.com/2022-11-22-U-S-Food-and-Drug-Administration-approves-CSLs-HEMGENIX-R-etranacogene-dezaparvovec-drlb,-the-first-gene-therapy-for-hemophilia-B>
50. Roctavian | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/roctavian>
51. Skysona | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/skysona>
52. Strimvelis | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/strimvelis>
53. Glybera | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/glybera>

54. Libmeldy | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/libmeldy>
55. Zynteglo | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zynteglo>
56. Upstaza | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/upstaza>
57. Imlygic | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/imlygic>
58. Novel haemophilia B gene therapy approved [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/news/227752/novel-haemophilia-b-gene-therapy-approved/>
59. El-Kadiry AEH, Rafei M, Shammaa R. Cell Therapy: Types, Regulation, and Clinical Benefits. Vol. 8, *Frontiers in Medicine*. Frontiers Media S.A.; 2021.
60. Cell and Gene Therapy | Lonza [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/PT/en/cell-and-gene-therapy
61. Wang LLW, Janes ME, Kumbhojkar N, Kapate N, Clegg JR, Prakash S, et al. Cell therapies in the clinic. Vol. 6, *Bioengineering and Translational Medicine*. Blackwell Publishing Ltd; 2021.
62. Buzhor E, Leshansky L, Blumenthal J, Barash H, Warshawsky D, Mazor Y, et al. Cell-based therapy approaches: The hope for incurable diseases. Vol. 9, *Regenerative Medicine*. Future Medicine Ltd.; 2014. p. 649–72.
63. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: Past, present, and future. Vol. 10, *Stem Cell Research and Therapy*. BioMed Central Ltd.; 2019.
64. Ntege EH, Sunami H, Shimizu Y. Advances in regenerative therapy: A review of the literature and future directions. Vol. 14, *Regenerative Therapy*. Japanese Society of Regenerative Medicine; 2020. p. 136–53.
65. Wrona E, Potemski P. A novel immunotherapy — The history of CAR T-cell therapy. Vol. 15, *Oncology in Clinical Practice*. Via Medica; 2019. p. 202–7.

66. Lin YJ, Mashouf LA, Lim M. CAR T Cell Therapy in Primary Brain Tumors: Current Investigations and the Future. Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
67. Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 2007 448:7150 [Internet]. 2007 Jun 27 [cited 2024 Jun 9];448(7150):196–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature05972>
68. Liu G, David BT, Trawczynski M, Fessler RG. *Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications*. Vol. 16, *Stem Cell Reviews and Reports*. Springer; 2020. p. 3–32.
69. Brons IGM, Smithers LE, Trotter MWB, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva De Sousa Lopes SM, et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 2007 448:7150 [Internet]. 2007 Jun 27 [cited 2024 Jun 9];448(7150):191–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature05950>
70. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861–72.
71. Yamanaka S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. Vol. 27, *Cell Stem Cell*. Cell Press; 2020. p. 523–31.
72. Mosaad YM. Hematopoietic stem cells: An overview. Vol. 51, *Transfusion and Apheresis Science*. Elsevier Ltd; 2014. p. 68–82.
73. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: A balancing act of stem cells in the skin. Vol. 10, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2009. p. 207–17.
74. Díaz-García D, Filipová A, Garza-Veloz I, Martínez-Fierro ML. A beginner's introduction to skin stem cells and wound healing. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2021.

75. Andreotti JP, Silva WN, Costa AC, Picoli CC, Bitencourt FCO, Coimbra-Campos LMC, et al. Neural stem cell niche heterogeneity. Vol. 95, *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd; 2019. p. 42–53.
76. Hmadcha A, Martin-Montalvo A, Gauthier BR, Soria B, Capilla-Gonzalez V. Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells for Cancer Therapy. Vol. 8, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
77. Yao P, Zhou L, Zhu L, Zhou B, Yu Q. Mesenchymal Stem Cells: A Potential Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases. Vol. 83, *European Neurology*. S. Karger AG; 2020. p. 235–41.
78. Plikus M V., Wang X, Sinha S, Forte E, Thompson SM, Herzog EL, et al. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. Vol. 184, *Cell*. Elsevier B.V.; 2021. p. 3852–72.
79. Dick MK, Miao JH, Limaiem F. Histology, Fibroblast. StatPearls [Internet]. 2023 May 1 [cited 2024 Jun 9]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541065/>
80. Keratinocytes | ATCC [Internet]. [cited 2024 Jun 9]. Available from: <https://www.atcc.org/cell-products/primary-cells/keratinocytes#t=productTab&numberOfResults=24>
81. Wang ZH, Liu LP, Zheng YW. Melanocyte stem cells in skin diseases and their potential in cell-based therapy. Vol. 37, *Histology and Histopathology*. Histology and Histopathology; 2022. p. 937–53.
82. Zhou Z, Xu MJ, Gao B. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. 2016; Available from: www.nature.com/cmi
83. Peng WC, Kraaier LJ, Kluiver TA. Hepatocyte organoids and cell transplantation: What the future holds. Vol. 53, *Experimental and Molecular Medicine*. Springer Nature; 2021. p. 1512–28.
84. Arutyunyan I V., Fatkhudinov TK, Makarov A V., Elchaninov A V., Sukhikh GT. Regenerative medicine of pancreatic islets. <http://www.wjgnet.com/> [Internet]. 2020 Jun 14 [cited 2024 Jun 9];26(22):2948–66. Available from: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v26/i22/2948.htm>

85. Chen H, Tan XN, Hu S, Liu RQ, Peng LH, Li YM, et al. Molecular Mechanisms of Chondrocyte Proliferation and Differentiation. Vol. 9, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
86. Dong C. Annual Review of Immunology Cytokine Regulation and Function in T Cells. 2021; Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-061020->
87. Ness S, Lin S, Gordon JR. Regulatory Dendritic Cells, T Cell Tolerance, and Dendritic Cell Therapy for Immunologic Disease. Vol. 12, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
88. Galati D, Zanotta S. Dendritic Cell and Cancer Therapy. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
89. Becker PSA, Suck G, Nowakowska P, Ullrich E, Seifried E, Bader P, et al. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2016 Apr 1;65(4):477–84.
90. Anderson NR, Minutolo NG, Gill S, Klichinsky M. Macrophage-based approaches for cancer immunotherapy. Vol. 81, *Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc.; 2021. p. 1201–8.
91. Hanna, J., & Hubel, A. (2009). Preservation of stem cells. *Organogenesis*, 5(3), 134–137.
92. Mousaei Ghasroldasht M, Seok J, Park HS, Liakath Ali FB, Al-Hendy A. Stem Cell Therapy: From Idea to Clinical Practice. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
93. FDA Approves Lantidra, the First Ever Cell Therapy for Type 1 Diabetes | DiaTribe [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: <https://diatribe.org/diabetes-research/fda-approves-lantidra-first-ever-cell-therapy-type-1-diabetes>
94. Kymriah | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kymriah>
95. Yescarta | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/yescarta>

96. Abecma | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/abecma>
97. FDA Approves Breyanzi for Relapsed/Refractory CLL/SLL [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: <https://www.curetoday.com/view/fda-approves-breyanzi-for-relapsed-refractory-ctl-sll>
98. Bristol Myers Squibb - U.S. FDA Approves Bristol Myers Squibb's Breyanzi ® as the First and Only CAR T Cell Therapy for Adults with Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) or Small Lymphocytic Lymphoma (SLL) [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: <https://news.bms.com/news/corporate-financial/2024/U.S.-FDA-Approves-Bristol-Myers-Squibbs-Breyanzi--as-the-First-and-Only-CAR-T-Cell-Therapy-for-Adults-with-Relapsed-or-Refractory-Chronic-Lymphocytic-Leukemia-CLL-or-Small-Lymphocytic-Lymphoma-SLL/default.aspx>
99. U.S. Food and Drug Administration Approves Bristol Myers Squibb's Breyanzi as a New CAR T Cell Therapy for Relapsed or Refractory Mantle Cell Lymphoma | Business Wire [Internet]. [cited 2024 Jun 9]. Available from: <https://www.businesswire.com/news/home/20240523741069/en/>
100. FDA Approves First Cell-Based Gene Therapy For Adult Patients with Relapsed or Refractory MCL | FDA [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-cell-based-gene-therapy-adult-patients-relapsed-or-refractory-mcl>
101. Provenge Advanced Prostate Cancer Treatment - Prostate Cancer | UCLA Health Jonsson Comprehensive Cancer Center [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: <https://www.uclahealth.org/cancer/cancer-services/prostate-cancer/prostate-cancer-treatment/advanced-prostate-cancer/provenge-advanced-prostate-cancer-treatment>
102. Wang YT, Merl MY, Yang J, Zhu ZX, Li GH. Opportunities for pharmacists to integrate pharmacogenomics into clinical practice. Vol. 20, *Pharmacogenomics Journal*. Springer Nature; 2020. p. 169–78.
103. Terapias Celulares e Genéticas | Novartis Portugal [Internet]. [cited 2024 Jun 10]. Available from: <https://www.novartis.com/pt-pt/profissionais-de-saude/terapias-celulares-e-geneticas>

104. Farmacêutica cobrou mais de 15 milhões para tratamento de 10 doentes com atrofia muscular espinal no Santa Maria - Expresso [Internet]. [cited 2024 Jun 10]. Available from: <https://expresso.pt/sociedade/saude/2023-12-13-Farmaceutica-cobrou-mais-de-15-milhoes-para-tratamento-de-10-doentes-com-atrofia-muscular-espinal-no-Santa-Maria-b9be0c48>
105. Comissão Nacional de Farmácia e Terapêutica - INFARMED, I.P. [Internet]. [cited 2024 Jun 10]. Available from: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/estrutura-e-organizacao/comissoes-tecnicas-especializadas/comissao_nacional_de_farmacacia_terapeutica
106. Autorização de Utilização Excecional (AUE) - INFARMED, I.P. [Internet]. [cited 2024 Jun 10]. Available from: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/autorizacao-de-introducao-no-mercado/autorizacao_de_utilizacao_especial
107. Programa de acesso precoce a medicamentos - INFARMED, I.P. [Internet]. [cited 2024 Jun 10]. Available from: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/avaliacao-terapeutica-e-economica/programa-de-acesso-precoce-a-medicamentos>
108. Medicamentos e dispositivos médicos | Fichas temáticas sobre a União Europeia | Parlamento Europeu [Internet]. [cited 2024 Jun 10]. Available from: <https://www.europarl.europa.eu/factsheets/pt/sheet/50/medicamentos-e-dispositivos-medicos>
109. Universidade de Coimbra cria novo centro de investigação de terapia génica para desenvolver tratamentos inovadores para doenças graves e sem cura [Internet]. [cited 2024 Jun 10]. Available from: <https://noticias.uc.pt/artigos/universidade-de-coimbra-cria-novo-centro-de-investigacao-de-terapia-genica-para-desenvolver-tratamentos-inovadores-para-doencas/>