



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Daniela Miranda Santos

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Terapia celular, um sucesso em oncologia, será uma boa estratégia para a Hepatite B Crónica?” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, da Dra. Ana Jerónimo, da Dra. Cláudia Ferreira e da Professora Doutora Olga Maria Fernandes Borges Ribeiro apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019

Daniela Miranda Santos

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Terapia celular, um sucesso em oncologia, será uma boa estratégia para a Hepatite B Crónica?” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, da Dr^a. Ana Jerónimo, da Dr^a. Cláudia Ferreira e da Professora Doutora Olga Maria Fernandes Borges Ribeiro e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019

1 2  9 0

UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Eu, Daniela Miranda Santos, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº2014209418 declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Terapia celular, um sucesso em oncologia, será uma boa estratégia para a hepatite B crónica?” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 6 de setembro de 2019.

Daniela Miranda Santos

(Daniela Miranda Santos)

AGRADECIMENTOS

A presente monografia e relatórios de estágio marcam o fim de uma etapa importante do meu percurso académico, pelo que não posso deixar de agradecer a todos aqueles que contribuíram para o meu sucesso:

À minha família pelo apoio incondicional, pelo esforço económico investido e por sempre acreditarem em mim e nas minhas capacidades, mesmo nos momentos mais difíceis.

Às minhas irmãs de Coimbra Carina Monteiro, Diana Carvalho, Constança Oliveira e Bianca Abreu, agradeço pelos tempos bem passados nesta cidade, pelas horas de confidências e de estudo partilhados e sobretudo, pelos ensinamentos e gargalhadas partilhadas.

À minha madrinha de Batismo Rosalina Quaresma, por toda a ajuda durante estes 5 anos.

Um obrigado à equipa da Farmácia Lusitana, em particular à minha orientadora Dr^a. Cláudia Ferreira pelos ensinamentos transmitidos.

Gostava também de agradecer à equipa da Bluepharma, em especial à Dr^a. Margarida Neves, à Dr^a. Ana Jerónimo e ao Dr. Tobias Silva pelos sábios conselhos e ensinamentos partilhados.

À Professora Doutora Olga Ribeiro, agradeço a disponibilidade e tempo investido na minha monografia.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, incluindo o corpo docente e não docente, um sincero obrigado, por me terem acolhido durante estes 5 anos.

This work was supported by the European Regional Development Fund (ERDF), through the COMPETE 2020 - Operational Programme for Competitiveness and Internationalization and Portuguese national funds via FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., under project POCI-01-0145-FEDER-030331 and the strategic projects POCI-01-0145-FEDER-007440 (UID/NEU/04539/2019).

PARTE I: Monografia

Terapia celular, um sucesso em oncologia, será uma boa estratégia para a
Hepatite B Crónica?

PARTE 2: Relatórios de Estágios Curriculares

2.A. Relatório de Estágio Curricular em Indústria Farmacêutica

2.B. Relatório de Estágio Curricular em Farmácia Comunitária

Índice

Índice de Ilustrações.....	9
Índice de Tabelas.....	9
PARTE I: Monografia	
Resumo	11
Abstract	12
Abreviaturas.....	13
1. Introdução.....	15
2. Hepatite B.....	16
2.1. Estrutura viral e ciclo de vida do VHB.....	16
2.2. Imunopatogênese.....	17
• Resposta imune inata (Inespecífica)	17
• A resposta imune adaptativa (Específica)	18
2.3. Tratamento atual e perspectivas futuras	21
3. Terapia Celular	23
3.1. Vacinas com células dendríticas modificadas.....	23
• Origem e Mecanismos de ação das DCs.....	23
• Aplicação na HBC.....	23
• Preparação ex vivo de DSc-Vacina	24
• Ensaios clínicos com DCs-Vacina.....	25
• Vantagens e limitações da DCs-Vacina	28
• Conclusão da DCs-Vacina	29
3.2. Vacinas terapêuticas de linfócitos T modificados	29
• Aplicação na HBC.....	29
• Vacina de Linfócitos T TCR.....	30
• Vacina de Linfócitos T CAR	31
4. Conclusão	37
5. Bibliografia.....	38
PARTE 2: Relatórios de Estágios Curriculares	
Abreviaturas.....	43
2.A. Relatório de Estágio Curricular em Indústria Farmacêutica.....	44
1. Introdução	45
2. Desenvolvimento de negócio.....	46

3. Análise SWOT	47
• FORÇAS	47
• Receção calorosa	47
• Equipa e Ambiente.....	48
• Melhoria contínua e trabalho de equipa	48
• Formação contínua	49
• Contacto internacional.....	49
• Utilização de bases de dados nacionais e internacionais.....	49
FRAQUEZAS	50
• Trabalho sedentário	50
• Pouco contacto com outros departamentos	50
OPORTUNIDADES.....	50
• Adquirir novos conhecimentos e desenvolver competências	50
• Integração e aplicação de conhecimentos adquiridos durante o MICF.....	51
• Compreensão do funcionamento de uma empresa farmacêutica.	51
• Promoção das várias saídas profissionais do farmacêutico	51
AMEAÇAS.....	52
• Conhecimento incompleto em determinadas áreas	52
• Subvalorização do Farmacêutico e Concorrência.....	52
4. Considerações Finais.....	52
2.B. Relatório de Estágio Curricular em Farmácia Comunitária	53
1. Introdução	54
2. Análise SWOT	54
FORÇAS	55
• Horário e Localização da farmácia.....	55
• Grande dimensão e variedade de produtos	56
• Formações	56
• Preparação de medicamentos manipulados.....	56
• Equipa e ambiente.....	57
• Serviços prestados.....	57
• Rastreamentos cardiovasculares gratuitos ao público e ateliers em escolas primárias	58
• SIFARMA 2000® e Novo módulo de atendimento do SIFARMA®	58
• Implementação dos Códigos DataMatrix.....	58

FRAQUEZAS.....	59
• Inexistência de alguns serviços farmacêuticos diferenciados	59
OPORTUNIDADES.....	59
• Aplicação dos conhecimentos adquiridos no MICF.....	59
• Compreensão das tarefas do farmacêutico comunitário.....	60
• Desenvolvimento do sentido crítico e autonomia.....	61
• Desenvolvimento de competências de comunicação.....	61
• Desenvolvimento de conhecimentos na área da dermocosmética, puericultura e suplementação	61
• Associação da DCI aos nomes de marca	62
• Contacto com varias estratégias de <i>marketing</i> e <i>merchandising</i>	62
AMEAÇAS.....	62
• Desacreditação do farmacêutico.....	62
• Medicamentos Esgotados.....	63
3. Considerações finais.....	63
Bibliografia	64
Anexos	66

Índice de Ilustrações

Figura 1: Ciclo de vida do VHB. Adaptado ^{5,10}	16
Figura 2: Interações das diferentes células do SI na resposta imune inata e adaptativa contra o VHB. Adaptado ⁶	18
Figura 3: (a) Serologia e virologia na HBA. (b) Serologia e virologia na HBC. Adaptado ³	20
Figura 4: Etapas da produção de vacinas de DCs. Adaptado ²³	24
Figura 5: Acoplamento do TCR do LT ao antígeno da célula alvo.....	30
Figura 6: As diversas etapas da produção das células T CAR. Adaptado ^{30,32}	32
Figura 7: CAR. Adaptado ³⁰	33
Figura 8: Designs do recetor de antígeno quimérico (CAR). Adaptado ³⁹	34

Índice de Tabelas

Tabela 1: Fármacos aprovados para o tratamento da HBC. Adaptado ³	21
Tabela 2: Fármacos em desenvolvimento clínico e pré-clínico para o tratamento da HBC....	22
Tabela 3: Ensaios Clínicos com DCs-Vacina pulsada com antígenos do VHB	27
Tabela 4: Vantagens e Limitações da DCs-Vacina	28
Tabela 5: Análise SWOT do estágio curricular em Indústria Farmacêutica.....	47
Tabela 6: Análise SWOT do Estágio Curricular em Farmácia Comunitária.	55

PARTE I: Monografia

Terapia celular, um sucesso em oncologia,
será uma boa estratégia para a Hepatite B
Crónica?

Resumo

A hepatite B (HB) é uma infecção causada pelo vírus da Hepatite B (VHB) e afeta mais de 2 bilhões de pessoas em todo o mundo^{1,2}. Apesar de a maioria dos doentes ter a capacidade de recuperar espontaneamente, através de uma forte resposta do sistema imunitário, atualmente, existem mais de 240 milhões de portadores crônicos^{1,2}.

A Hepatite B crônica (HBC) é caracterizada pela persistência do VHB associada a uma resposta imune insuficiente, que a longo prazo causa uma forte exaustão do sistema Imune (SI), nomeadamente dos linfócitos T (LT) CD8+ e CD4+, e consequente, lesão hepática³. Os mecanismos responsáveis por esta exaustão ainda não são completamente conhecidos³.

Os fármacos antivirais usados no tratamento da HBC atuam ao nível do ciclo de vida do VHB e são eficazes a suprimir a replicação viral mas, na maioria dos casos, não conseguem eliminar o ácido desoxirribonucleico circular covalentemente fechado (cccDNA) completamente, além de apresentarem vários efeitos adversos, resistência viral e custos elevados⁴. Efetivamente acredita-se que para uma eliminação total e eficaz do cccDNA é necessário um efeito combinado da supressão da multiplicação do vírus e da reconstituição da resposta imune específica^{1,3}. Avanços recentes na compreensão da exaustão dos LT na HBC providenciaram abordagens terapêuticas inovadoras, nomeadamente as imunoterapias, que nos aproximam da possibilidade de uma cura funcional da infecção crônica pelo VHB⁵. Esta revisão aborda as diversas estratégias terapêuticas que estão a ser estudadas para o tratamento da HBC, dando destaque às terapias celulares, nomeadamente as vacinas terapêuticas baseadas em células dendríticas (DCs) e as vacinas terapêuticas baseadas em LT, através da discussão dos resultados obtidos em estudos pré-clínicos e clínicos. Para dar algum *background* de introdução ao tema também é feito uma breve apresentação da doença e da sua Imunopatogénese.

Palavras-chave: Hepatite B crónica; Imunoterapia; Terapias celulares; Células dendríticas; Linfócitos T.

Abstract

Hepatitis B is an infection caused by the hepatitis B virus and affects more than 2 billion people worldwide^{1,2}. Although most patients have the ability to recover spontaneously through a strong immune system response, there are more than 240 million chronic carriers today^{1,2}.

Chronic hepatitis B is characterized by HBV persistence associated with an insufficient immune response, which in the long term causes severe exhaustion of the immune system, namely CD8 + and CD4 + T lymphocytes, and consequently liver damage³. The mechanisms responsible for this exhaustion are not completely known yet³.

Antiviral drugs used to treat HBC act at the level of the HBV life cycle and are effective in suppressing viral replication but in most cases cannot completely eliminate the cccDNA and have several adverse effects, viral resistance and high costs⁴.

It is believed that for a total and effective elimination of cccDNA a combined effect of suppressing virus multiplication and reconstituting the specific immune response is required^{1,3}. Recent advances in understanding LT exhaustion in HBC have provided innovative therapeutic approaches, like immunotherapies, that bring us closer to the possibility of a functional cure of chronic HBV infection⁵. This review addresses the various therapeutic strategies being studied for the treatment of HBC, highlighting cell therapies, namely dendritic cell-based vaccines and LT-based vaccines, through discussion of results obtained in preclinical and clinical studies. To give some background introduction to the subject, a brief presentation of the disease and its Immunopathogenesis is also made.

Keywords: Chronic hepatitis B; Immunotherapy; Cell therapies; dendritic cells; T lymphocytes.

Abreviaturas

- **Abreviaturas em Português**

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

ALT - Alanina aminotransferase

CHC - Carcinoma hepatocelular

HB - Hepatite B

HBA - Hepatite B aguda

HBC - Hepatite B crónica

IL - Interleucina

LT - Linfócito T

SI - Sistema Imunitário

VHB - Vírus da Hepatite B

- **Abreviaturas em Inglês**

APC - Antigen presenting cell (célula apresentadora de antígeno)

CAR - Chimeric antigen receptor (recetor do antígeno quimérico)

cccDNA - Covalently closed circular deoxyribonucleic acid (ADN circular covalentemente fechado)

DCs - Dendritic cells (células dendríticas)

GM-CSF - Granulocyte and macrophage colony stimulating factor (fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos)

HBcAb - anti-HBcAg antibody (anticorpo anti-HBsAg)

HBcAg - Hepatitis B core antigen (antígeno do core da hepatite B)

HBeAb - anti-HBeAg antibody (anticorpo anti-HBeAg)

HBeAg - Hepatitis B e antigen (antígeno e da hepatite B)

HBsAb - anti-HBsAg antibody (anticorpo anti-HBsAg)

HBsAg - Hepatitis B surface antigen (antígeno de superfície da hepatite B)

HSC - Hematopoietic stem cell (células estaminais hematopoiéticas)

INF - Interferon (interferões)

MHC - Major histocompatibility complex (complexo major de histocompatibilidade)

NK - Natural killer cell

PBS - Phosphate Buffer Saline (solução salina de tampão fosfato)

RNA - Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)

RNAi - Interference Ribonucleic acid (ácido ribonucleico de interferência)

RNAi - RNA interference (ácido ribonucleico de interferência)

scFv - Single Chain Variable Fragment (fragmento variável de cadeia única)

TCR - T cell receptor (recetor das células T)

Th - T helper (célula T auxiliar)

TLR - Toll like receptor (recetor do tipo toll)

TNF - Tumor necrosis factor (fator de necrose tumoral)

I. Introdução

A prevalência mundial da infecção pelo VHB diminuiu bastante com a introdução de diversas medidas preventivas, entre elas a introdução da vacina profilática contra a HB¹. Não obstante, o número elevado de portadores crônicos com VHB continua a ser um problema de saúde global¹. As terapias antivirais atuais, tais como o interferão e os análogos de nucleósidos, reduzem a progressão da doença nos doentes com HBC, no entanto não conseguem eliminar o cccDNA viral⁴. A descontinuação do tratamento resulta com frequência na evolução da HBC para estádios mais avançados como a cirrose ou até mesmo hepatocarcinoma⁴.

A resposta dos (LT) durante a hepatite B aguda autolimitada é caracterizada por uma resposta de LT citotóxicos (CD8+) e auxiliares (CD4+) vigorosa, policlonal e multiespecífica que permite a eliminação do vírus e garante a cura⁴. Em contraste, observa-se que a resposta imune em portadores crônicos do vírus, incapazes de eliminar o vírus, é fraca ou indetetável, resultando na persistência do vírus no hospedeiro⁴. Diversos investigadores apontam como causa dominante da persistência viral e evolução para HBC, a existência de uma resposta imunitária antiviral fraca⁶. Desta forma, a utilização de imunoterapias que fortaleçam o sistema imunitário (SI), parece ser parte da chave para a eliminação do vírus⁷. Efetivamente as imunoterapias têm estado a ser usadas para o tratamento de alguns cancros, no entanto, nenhuma está ainda aprovada para a HBC⁸. Não obstante, são várias as hipóteses que já estão a ser estudadas, nomeadamente, as vacinas terapêuticas tais como, vacinas de ADN (ácido desoxirribonucleico), vacinas proteicas, e vacinas celulares e ainda os agonistas TLR (*Toll like receptor*) e os *immuno checkpoint inhibitors*⁸. Em particular, as vacinas terapêuticas celulares baseiam-se na seleção de células específicas do sangue periférico do paciente com HBC, seguida da sua manipulação *ex vivo* e posterior administração ao doente das células manipuladas⁷. Neste tipo de imunoterapia têm sido testadas as DCs e os LT⁷. Segundo alguns estudos, esta abordagem parece ser bastante promissora, pois inverte o estado de imunossupressão de LT causada pelo VHB, promovendo assim a eliminação do cccDNA do vírus⁷. No entanto, o número de ensaios clínicos ainda é insuficiente para demonstrar a eficácia clínica desta imunoterapia. Este texto de revisão pretende fazer uma análise dos estudos existentes. Para melhor compreensão do tema, faz-se no início do texto uma revisão sobre a estrutura do VHB e o seu ciclo de vida e ainda sobre a imunopatogénese da doença.

2. Hepatite B

2.1. Estrutura viral e ciclo de vida do VHB

O virião completo da hepatite B foi descoberto por Dane e, por esse motivo o vírus também é apelidado de “partícula de Dane”, tem forma esférica ou filamentosa e cerca de 40 nanômetros de diâmetro⁹. O VHB é envelopado bilipídico hepatotrópico do gênero *Orthohepadnavirus*, da família *Hepadnaviridae* e tem pelo menos oito genótipos principais (de A a H)^{1,10}. O genoma é constituído por ADN circular de cadeia dupla incompleto (a cadeia de polaridade positiva é incompleta, sendo 50 % a 70 % da cadeia de polaridade negativa), envolvido por uma cápside icosaédrica¹⁰. O genoma viral é extremamente compacto e a cadeia de polaridade positiva codifica quatro genes denominados S, C, P e X¹¹. O gene S codifica as proteínas do envelope viral, o gene C codifica a proteína da estrutura da cápside viral, conhecida como a proteína do core ou nucleocápside, o gene P codifica o ADN da polimerase viral, que também é uma transcriptase reversa, e o gene X codifica uma proteína reguladora¹¹.

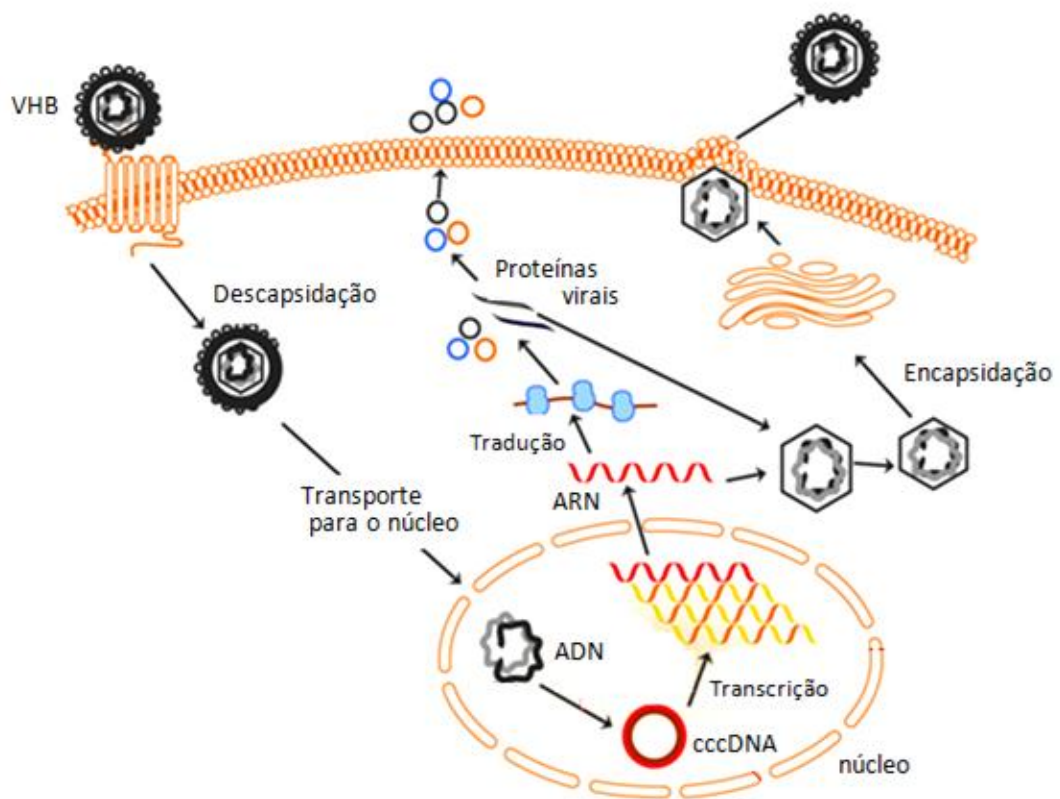


Figura 1: Ciclo de vida do VHB. Adaptado^{5,10}.

A Figura 1 representa o ciclo de vida do VHB dentro do hepatócito. De forma resumida, depois do vírus entrar na célula, por fusão do envelope viral com a membrana do hepatócito, o genoma viral entra no núcleo, e o ADN é convertido em cccDNA^{1,12}. O

cccDNA desempenha um papel fundamental na manutenção da infecção pelo VHB, principalmente nos portadores crônicos, uma vez que o ciclo de replicação do vírus da hepatite B inicia com a transcrição reversa do cccDNA (molde para a transcrição) em RNA (Ácido Ribonucleico) mensageiro¹. Este intermediário de RNA dará origem a novo ADN viral e, através da tradução, as proteínas virais, incluindo proteínas da superfície do vírus da hepatite B e proteínas da cápside, permitindo a produção de novos viriões, como demonstrado na Figura 1¹.

2.2. Imunopatogénese

Após infecção pelo VHB o sistema imunitário do hospedeiro monta uma resposta imunológica para tentar eliminar o vírus a qual depende de uma interação complexa de vários sistemas celulares representados na figura 2^{3,6}. A resolução da hepatite B aguda com eliminação do antigénio de superfície da HB (HBsAg) do soro e desenvolvimento de imunidade protetora ocorre em mais de 95 % dos pacientes adultos³. No entanto, a resolução da infecção aguda ou a evolução para infecção crónica depende, para além do estado imunológico, da idade do indivíduo: quanto menor a idade do paciente e mais fraco o SI, maior a probabilidade de a infecção evoluir para crónica (recém-nascidos tem 90 % de probabilidade de vir a ter infecção crónica)³. Os determinantes imunológicos da eliminação bem-sucedida de VHB não estão totalmente compreendidos, mas sabe-se que tanto as respostas imunes inata e adaptativa, nomeadamente a resposta baseada em anticorpos e a resposta baseada em células, parecem ter um papel importante³. Ao mesmo tempo, acredita-se que a inflamação e a lesão do fígado, observadas no decurso de uma infecção pelo VHB, sejam amplamente mediadas pelo próprio sistema imunológico³. Por conseguinte, existe uma interação complexa entre o VHB e o SI do hospedeiro na depuração inicial do VHB, na persistência a longo prazo do VHB e na lesão hepática³.

Resposta imune inata (Inespecífica)

Após a entrada do VHB no hepatócito, as primeiras respostas induzidas pelo sistema imunitário do hospedeiro são inespecíficas, não citopáticas e incluem a produção de citocinas antivirais pelas células da resposta inatas e adaptativas, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF) e o interferon alfa e beta (IFN- α/β)³. Estes por sua vez inibem a replicação viral sem a destruição direta das células infetadas^{3,31}. Conforme ilustrado na figura 2, o IFN- α/β promovem a ativação de células dendríticas (DCs) e de células de Kupffer (macrófagos que residem no fígado), que por sua vez estimulam as células *natural killer* (NK) a libertar INF- γ que leva à inibição da replicação viral^{3,6}. Este mecanismo inespecífico não está totalmente

compreendido na infecção pelo VHB, embora se saiba que inibe a replicação do VHB^{3,6}. A resposta imune adaptativa, dirigida especificamente contra proteínas virais, aparece mais tarde e torna-se crucial para eliminar o VHB¹³.

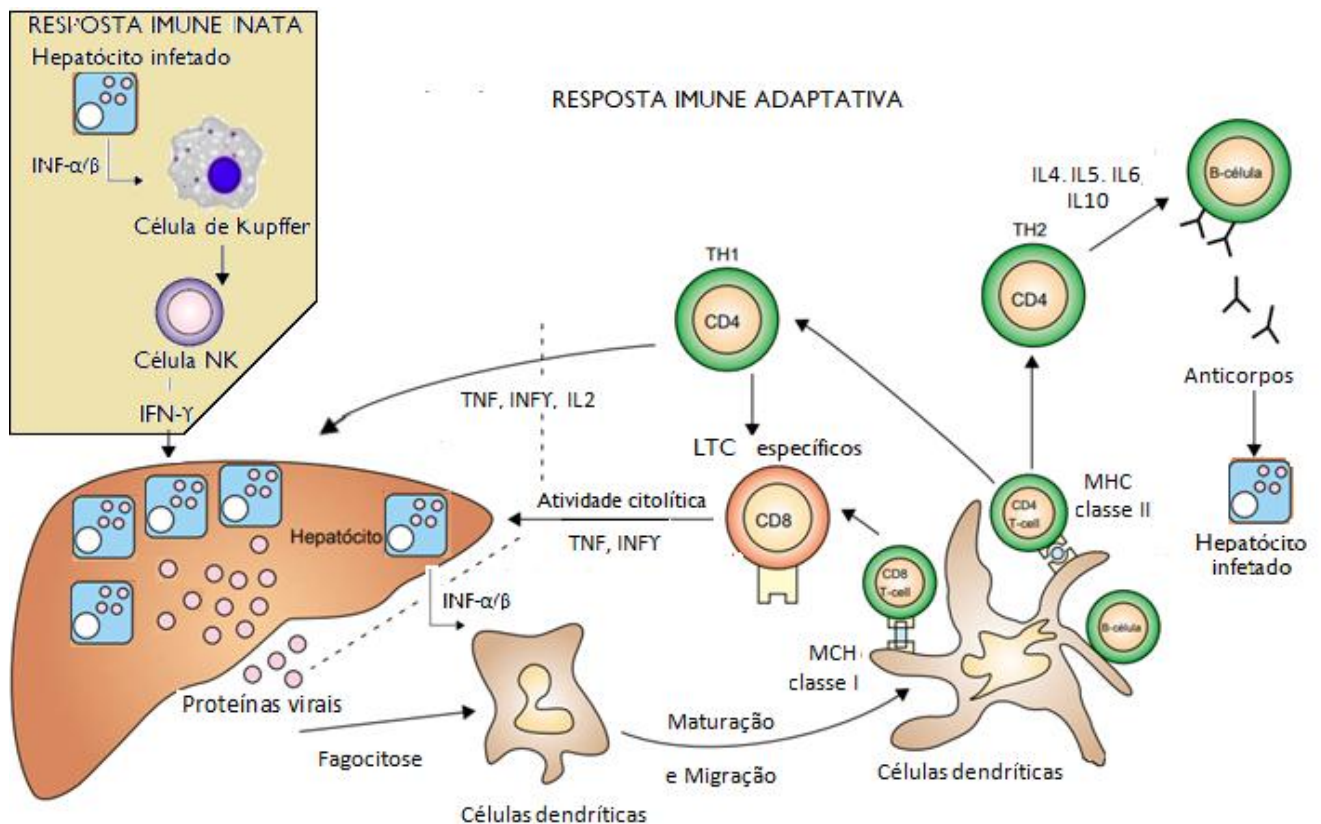


Figura 2: Interações das diferentes células do SI na resposta imune inata e adaptativa contra o VHB. Adaptado⁶.

A resposta imune adaptativa (Específica)

Na infecção pelo VHB a resposta adaptativa celular é fundamental para a clearance do vírus³. As células apresentadoras de antígenos (APCs), nomeadamente células de Kupffer e em particular as DCs, através da apresentação de antígenos virais são importantes para a ativação e diferenciação das células T CD8⁺ e T CD4⁺, tornando-as assim específicas para antígenos do VHB³. Estes linfócitos T são os principais efetores da depuração do VHB³. As células T CD8⁺ (LT Citotóxicos) específicos para VHB são capazes de eliminar hepatócitos infectados pelo VHB através da secreção de citocinas antivirais, tais como INFs e o TNF- α e através de mecanismos citotóxicos diretos, como ilustrado na figura 2^{3,6}. As células T CD4⁺ (LT auxiliares) específicas podem ser divididas em 2 populações principais: as células T auxiliares tipo 1 (Th1) que segregam as citocinas antivirais, como o INF- γ , TNF e IL-2 (interleucina-2) e auxiliam a resposta mediada pelos CD8⁺, e as células T auxiliares tipo 2

(Th2), que libertam IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, citocinas que auxiliam a resposta mediada pelos linfócitos B⁶. O fígado produz quimiocinas que atraem os linfócitos T específicos para o fígado, para facilitar o acoplamento com os hepatócitos infectados⁶. Em pacientes que recuperam da infecção aguda pelo VHB, as células T CD4 + ativadas ligam-se aos linfócitos B, os quais depois produzem anticorpos específicos de diversas proteínas do vírus, tais como o HBsAg, o antígeno do core da HB (HBcAg) e o antígeno e da HB (HBeAg) como ilustrado na figura 2³. Estes anticorpos conferem imunidade a longo prazo e desempenham um papel protetor fundamental na prevenção da propagação do VHB a hepatócitos não infectados³.

Indivíduos com hepatite B aguda (HBA) desenvolvem uma resposta imune vigorosa específica contra diversos antígenos do VHB³. Como demonstrado na figura 3 (a), inicialmente há um aumento da carga viral, que diminui rapidamente devido à forte resposta imune do hospedeiro com produção de LT específicos para o VHB³. Efetivamente, a eliminação do vírus pelo SI do hospedeiro ocorre por mecanismos não citopáticos, mediados em grande parte por citocinas antivirais, produzidas pelas células da resposta imune inata e adaptativa, pelo que a replicação viral é inibida sem a destruição direta das células infectadas^{1,3}. Assim, a carga viral do VHB diminui antes de um aumento na alanina aminotransferase (ALT) e em alguns casos nem é detetada elevação da ALT³. Como se pode verificar na figura 3 (a) o aparecimento do anticorpo anti-HBcAg (HBcAb), do anticorpo anti-HBsAg (HBsAb) e do anticorpo anti-HBeAg (HBeAb), ocorre após o declínio da carga viral do VHB e conferem imunidade a longo prazo³. Em infecções agudas, a resposta de células T CD8 + específicas para o VHB é, para além de vigorosa, policlonal e multiespecífica, significando que vários epítomos virais são reconhecidos por uma única célula T CD8 +, reduzindo uma possível "fuga" viral via mutação³.

Em contraste com a HBA, indivíduos com HBC desencadeiam uma resposta imune anti-VHB fraca e muitas vezes indetetável, causadora da persistência do VHB no hospedeiro¹⁴. Esta contínua, mas ineficiente, resposta imune anti-VHB, para além de não conseguir eliminar o VHB, leva à exaustão das células T específicas para o VHB (CD4+ e CD8+) e portanto, estas tornam-se quantitativamente, metabolicamente e funcionalmente defeituosas em pacientes com hepatite B crónica^{14,15}. Por outro lado, verifica-se que, em doentes com hepatite B crónica ocorre a migração de células que desencadeiam os processos inflamatórios, incluindo células T específicas e não específicas do VHB¹⁶. Estas medeiam a atividade citolítica de hepatócitos infectados, na tentativa de eliminar o VHB¹⁶. No entanto, como esta é insuficiente para eliminar completamente o VHB ocorre uma resposta inflamatória persistente e ineficaz que, para além de provocar a exaustão do SI, leva à necrose dos hepatócitos, a danos no fígado, e a longo prazo, aumenta o risco de

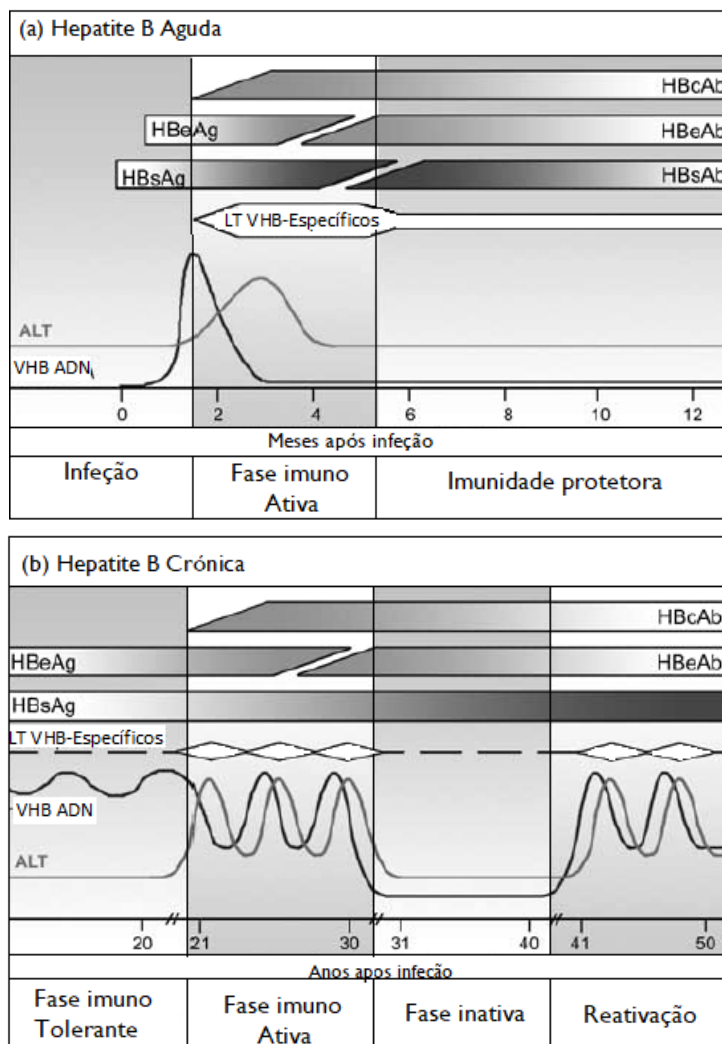


Figura 3: (a) Serologia e virologia na HBA. (b) Serologia e virologia na HBC. Adaptado³

O curso natural da hepatite B crônica consiste em 4 fases distintas apresentadas na figura 3 (b) resultantes da interação entre o vírus, os hepatócitos e a resposta imune do hospedeiro: Fase imuno tolerante, fase imuno ativa, fase inativa e reativação^{2,11,17}. Na fase imuno tolerante, a carga viral é elevada (replicação ativa), a atividade necroinflamatória é discreta e não citopática, pelo que, a ALT está normal e geralmente, não há progressão da doença^{11,17}. Na fase imuno ativa há uma resposta imune vigorosa do hospedeiro contra o vírus da hepatite B, levando à queda das concentrações de ADN do VHB e a uma reação inflamatória com efeito citopático causadora de necrose de hepatócitos e, portanto, a concentrações mais altas de ALT^{11,18}. Também aparecem os HBcAb e HBeAb^{11,18}. Na terceira fase (fase inativa) ou fase de baixa replicação nota-se a presença de títulos baixos ou indetectáveis do ADN-VHB, ALT normal, mínima lesão hepática, e de bom prognóstico^{11,18}. Os pacientes nesta fase são considerados portadores crônicos inativos do VHB e podem permanecer inativos por toda a vida^{11,18}. Cerca de 20 % a 30 % dos pacientes podem entrar na fase de reativação, onde ocorre novamente o aumento da replicação viral, com aumento

descompensação hepática, cirrose ou até mesmo carcinoma hepatocelular (CHC)¹⁶. Assim, a hepatite B crônica coincide com o declínio dos níveis de ADN do VHB e com o aumento ALT que espelha a lesão hepática³. O mecanismo de persistência do VHB não é totalmente compreendido, mas é provavelmente multifatorial, incluindo a supressão imune, a existência de fatores virais e a persistência de formas estáveis do VHB, como o cccDNA³.

do ADN Viral e da ALT^{11,18}. Os portadores crônicos de VHB não apresentam anti-HBsAg, pelo menos em concentrações consideradas protetoras¹⁸.

2.3. Tratamento atual e perspectivas futuras

Os principais objetivos do tratamento contra o VHB são suprimir a multiplicação do vírus, restaurar a função imunológica específica contra o vírus, reduzir a necrose inflamatória hepática, prevenir a descompensação hepática e cirrose, e bloquear o desenvolvimento do CHC³. Atualmente, os fármacos aprovados e utilizados no tratamento da Hepatite B são os apresentados na tabela 1³. Os INFs funcionam como moduladores imunológicos e possuem fraca ação antiviral direta enquanto que, os análogos dos nucleot(s)idos tem apenas ação antiviral direta, sendo ambos eficazes a suprimir a replicação do VHB³.

Tabela 1: Fármacos aprovados para o tratamento da HBC. Adaptado³

Classe	Molécula	Nome comercial
Interferões (INFs)	Interferão alfa	INF- α
	Interferão α -2a peguilado	PEG-INF- α -2 ^a
Análogos de nucleósidos	Lamivudina	Epivir [®]
	Entecavir	Baraclude [®]
	Telbivudina	Tyzeka [®]
Análogos de nucleótidos	Adefovir dipivoxil	Hepsera [®]
	Tenofovir	Viread [®]
	Tenofovir alafenamide	Vemlidy [®]

Os fármacos atuais conseguem suprimir o VHB abrindo uma janela para a reconstituição da resposta imune específica para o VHB, no entanto, estes fármacos não conseguem eliminar completamente o cccDNA dos hepatócitos infetados e evitar a evolução para HBC^{3,8}. Por outro lado, a sua utilização contínua está associada a efeitos secundários a longo prazo e pode induzir a resistência do vírus, o que torna estes fármacos falíveis^{3,8}. Assim sendo, a necessidade de novas soluções, inovadoras para o tratamento de HBC levou ao aumento da investigação nesta área e ao aparecimento de novos candidatos⁶. Na tabela 2 podemos consultar os potenciais candidatos que estão atualmente em ensaios clínicos e pré-clínicos para o tratamento da HBC. Existem dois grandes grupos de fármacos a serem estudados, os antivirais diretos e os imunomoduladores⁷. Efetivamente, o papel das células T e B específicas do VHB permanecem crucial na eliminação de hepatócitos transportadores de cccDNA e no controlo a longo prazo da infeção pelo VHB, pelo que os cientistas têm apostado cada vez mais na imunoterapia^{9,16}. Os antivirais diretos atuam em etapas distintas do processo de infeção de células pelo VHB e apesar de já existirem alguns fármacos

aprovados (indicados na Tabela 1), estão a ser estudados e desenvolvidos outros, entre eles novos inibidores da entrada viral, novos inibidores da polimerase, inibidores da encapsidação, bloqueadores de liberação do vírus, inibidores da transcrição (RNAi), inibidores das proteínas virais e inibidores do cccDNA (edição de genes)⁷. Os imunomoduladores têm como objetivo potencializar a resposta imune específica contra o VHB do hospedeiro, que devido à infecção está suprimida⁷. Ainda não existem imunomoduladores aprovados para o tratamento da HBC, no entanto, estudos indicam que a imunoterapia é a chave para uma eliminação viral sustentada^{3,8}. As novas terapias em ensaios clínicos utilizam o efeito combinado de supressão viral e da reconstituição da imunidade específica ao VHB para uma depuração eficaz da infecção a longo prazo^{3,8}. Atualmente estão a ser estudados para o tratamento da HBC várias imunoterapias: os agonistas TLR, os *Immuno Checkpoint inhibitors* e ainda as vacinas terapêuticas, como as vacinas de ADN, as vacinas proteicas e as terapias celulares, estas últimas serão tratadas com maior profundidade neste trabalho de revisão^{3,8}.

Tabela 2: Fármacos em desenvolvimento clínico e pré-clínico para o tratamento da HBC.

	Classe Terapêutica		Fármaco
Antivirais diretos	Inibidores da entrada do VHB		Myrcludex-B.
	Inibidores da polimerase		AGX-1009; CMX-157.
	Inibidores da encapsidação		BAY41-4109; GLS4; NVR 3-778; JNJ 56136379; ABI-H0731; RO6864018; QL-007; ABI-2158; NVR-221; AT-61; AT-130; GLP-26; EP-027367; QL-0A6a; AB-506; AB-423; CB-HBV-001.
	Inibidores da libertação do VHB		REP AC; REP 9 AC; REP 2168-MG; O7020322; BM601.
	Inibidores do cccDNA		CRISP/CASP9; Zinc-Finger nucleases; TALENS;
	Inibidores da transcrição (RNAi)		ARC-520; ARC-521; ARO-HBV; Vir-2218; RG-6004; ARB-1467; Lunar- HBV; AB-729; ARO-1740; DCR-HBVS; BB-103.
	Inibidor das proteínas virais		IONIS-HBVRx; IONIS- HBVLRx.
Imuno modeladores	Agonistas TLR		Biripant.
	Immuno checkpoint inhibitors		Anti-PD1.
	Vacinas Terapêuticas	Vacinas de ADN	ANRS HB02; INO-1800; Vacina ADN dual-plasmid; GX-100; GX-110; pDPSC18; CVI-HBV-002; VR-CHB01; Altravax; TG1050; AIC649.
		Vacinas proteicas	GenHevac; YIC; GenHevac B; Sci-B-Vac; Pagasys; HB-AS02V; DV601; Nasvac; ABC203; TVAX-008; GS- 4774; Vaxine's HBV; VBI-260; CY1899; ePA-44; Hep T cell-FP-02,2; Chimigen HBV.
Vacinas Celulares		DCs Vaccine; HPDCs-T; CAR-T; LTCR-H2-1.	

3. Terapia Celular

Recentemente, um novo campo de pesquisa imunológica e aplicação clínica foi desenvolvido para o tratamento de várias patologias: a terapia celular, que irei abordar daqui para a frente⁸. Este tipo de terapia baseia-se em retirar determinadas células do sangue periférico dos doentes, modificá-las *ex vivo* e reintroduzi-las novamente ao mesmo doente⁸. Esta terapia tem tido muito sucesso no tratamento de vários câncros, pelo que vários investigadores têm estudado esta estratégia para tratar infeções virais crónicas como a HBC⁸. O objetivo desta terapia na HBC é induzir respostas imunes específicas anti-VHB, colmatando a imunossupressão característica e assim promover o controlo viral⁵. Estão a ser estudadas dois tipos de terapia celulares para a HBC: as vacinas terapêuticas baseadas em DCs e as vacinas terapêuticas baseadas em linfócitos T (LT), que irei abordar daqui para a frente^{3,8}.

3.1. Vacinas com células dendríticas modificadas

Origem e Mecanismos de ação das DCs

As DCs, inicialmente descritas por Steinman e Cohn, são produzidas na medula óssea, a partir de células estaminais hematopoiéticas (HSC), são células profissionais apresentadoras de antígenos e desempenham um papel fundamental na indução de respostas mediadas por células T e B^{13,19}. Para além de expressarem elevados níveis de moléculas co-estimuladoras e citocinas pró-inflamatórias, as DCs também expressam o MHC (complexo maior de histocompatibilidade) I e II, tornando-se aptas a apresentar os antígenos virais aos linfócitos T naïve²⁰. O resultado destas cascatas de respostas imunológicas é a produção de linfócitos citotóxicos e de anticorpos específicos do vírus, que favorecem a eliminação do vírus¹³.

Aplicação na HBC

Tem sido muito bem documentado e demonstrado em ensaios clínicos que esta vacina tem elevado potencial como imunoterapia para o tratamento de alguns câncros, através da indução de imunidade específica²¹. Contudo, pouco se sabe sobre o seu uso terapêutico fora do cancro, pelo que até ao momento, as vacinas de DCs apenas foram usadas no tratamento do cancro avançado^{21, 22}.

Pensa-se que o alto nível sérico de HBsAg seja o responsável pela exaustão de células T e conseqüente a supressão da resposta imune³. No entanto, ao longo dos anos outras teorias foram elaboradas para justificar a supressão imune que ocorre na hepatite B crónica³. Uma das teorias apresentada foi que as DCs estão funcionalmente alteradas em pacientes

com hepatite B crônica³. Estudos *in vitro* mostram que após o contacto com o HBsAg há uma diminuição da sua capacidade estimuladora de células T, bem como, uma redução da produção de INF- γ , TNF- α e IL-12, o que comprova que esses defeitos funcionais das DCs, podem ser responsáveis pela diminuição da capacidade de antígenos de VHB serem apresentados ao sistema imune do hospedeiro dificultando a eliminação do VHB e promovendo a sua persistência^{3,6,21}. Com base nestas observações, diferentes abordagens terapêuticas foram desenvolvidas para ativar as DCs¹³. A mais notável delas foi a vacina terapêutica contendo DCs autólogas pulsadas (*ex vivo*) com o um antígeno VHB-específico e re-administradas aos pacientes com o objetivo de induzir respostas de células T (CD8+ e CD4+) e B específicas para o VHB, suficientemente robustas e de longa duração^{8,13,23}. Efetivamente, esta imunoterapia baseada em DCs modificadas parece ajudar a colmatar o problema da imunossupressão em pacientes com HBC e portanto, pode tornar-se um método prospectivo para tratar a HBC²¹.

Preparação *ex vivo* de DCs-Vacina

As DCs utilizadas para estas vacinas são derivadas de células mononucleares de sangue periférico humano, (monócitos CD14+) obtidas do sangue de um indivíduo após citafereze ou leucaferese, conforme ilustrado na figura 4²³. A diferenciação de monócitos CD14+ em DCs envolve a cultura de células, durante 7 dias, na presença de GM-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos) e IL-4²³. Essas DCs são recuperadas da cultura e lavadas 3 vezes com solução salina de tampão fosfato (PBS)²⁴.

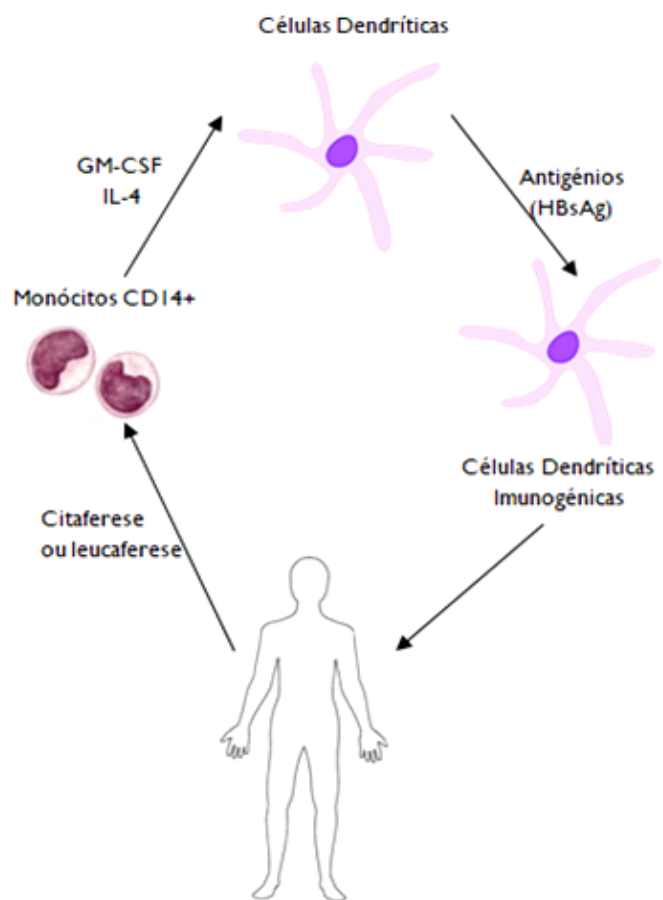


Figura 4: Etapas da produção de DCs-vacinas. Adaptado²³

Depois as DCs isoladas são carregadas com antígenos específicos^{20,23}. No caso específico da preparação ex vivo de vacinas de DCs pulsadas com o HBsAg para o tratamento da HBC, as DCs são cultivadas, com uma vacina humana disponível comercialmente contendo apenas HBsAg, a 37 °C numa atmosfera humidificada contendo 5 % de CO₂ durante 8 h a 24 h²⁴. O HBsAg durante este período de incubação internaliza na DCs e o excesso de HBsAg livre é depois eliminado através de 5 lavagens com PBS^{13,24}. Após a última lavagem, as soluções finais são preservadas a -20 °C^{13,24}. A DCs pulsadas com o HBsAg são re-administradas no indivíduo e, no organismo, migram para os tecidos linfoides onde apresentam o antígeno aos linfócitos T *naive*^{22,25}.

Ensaio clínico com DCs-vacina

Até hoje 4 ensaios clínicos de fase I utilizando Vacinas contendo DCs foram desenvolvidos para avaliar a segurança e eficácia desta terapia, sendo que 2 deles foram realizados na China e os outros dois no Japão, conforme resumido na Tabela 3^{13,16,22,24}. Nos 4 ensaios clínicos, a preparação da vacina incluiu a recolha e o isolamento dos monócitos CD14+ do sangue periférico de cada indivíduo, seguida da sua cultura com GM-CSF e IL-4 para obtenção de DCs¹³. Depois, essas DCs foram pulsadas com antígenos específicos do VHB, e administradas novamente aos indivíduos como demonstrado na figura 4¹³. Em todos eles a vacina mostrou ser segura e bem tolerada sem nenhuma evidência de anormalidades físicas, imunológicas e bioquímicas^{13,16,22,24}.

Num ensaio clínico fase I realizado no Japão e publicado em 2003, DCs pulsadas com o HBsAg foram administradas em toma única, a 5 voluntários saudáveis, levando a um aumento da expressão dos anticorpos do anti-HBsAg em dois voluntários positivos para os anticorpos anti-HBsAg (tinham levado a vacina profilática), e em dois voluntários negativos (não tinham levado a vacina profilática)¹³. Outro ensaio clínico de fase I desenvolvido também no Japão, e publicado em 2010, DCs pulsadas com o HBsAg foram administradas a 5 pessoas com HBC 1, 2 ou 3 vezes ao longo de 4 meses, resultando na indução de níveis elevados de INF- γ e IL-12 e no aparecimento de anticorpos anti-HBsAg em 2 pacientes e de células T HBsAg-específicas em um²⁴.

Noutro ensaio clínico de fase I, realizado na China, e publicado em 2005, 19 pacientes com HBC, receberam duas doses de uma vacina de DCs pulsada com HBsAg, sendo que a dois deles foi-lhes co-administrada 100 mg de lamivudina por dia, durante um ano¹⁶. Observou-se que 11 pacientes tiveram uma diminuição dos níveis de ADN do VHB, 10 ficaram negativos para o HBeAg, e 5 seroconverteram o HBeAg em HBeAb¹⁶. Tanto pacientes com ALT elevada como normal tiveram resposta clínica o que sugere que a terapia

com HBsAg-DCs pode ser adaptada tanto em pacientes com ALT elevada como normal, ao contrário de alguns medicamentos antivirais atuais como o INF- α e a lamivudina que tem um melhor efeito apenas em pacientes com ALT elevada¹⁶. Os 2 pacientes tratados com HBsAg-DC e lamivudina ficaram negativos para o ADN do VHB e um ficou positivo para HBeAb¹⁶. Isto indica que a co-aplicação da vacina DCs e outros fármacos pode aumentar a sua capacidade de resposta e ter efeitos mais rápidos na eliminação do VHB¹⁶.

Tendo em conta os resultados destes 3 ensaios clínicos, a vacina de DCs pulsadas com HBsAg parece conseguir aumentar a produção de IL-12 e INF- γ , que controla a replicação viral, e induzir a produção de anticorpos anti-HBsAg, sugerindo que a vacina de DCs autólogas pulsadas com HBsAg, ativa as células T CD4+ e reconstrói a função imunológica dos pacientes, nomeadamente a imunidade humoral²⁴. Também parece conseguir induzir imunidade celular específica (LT CD8+) contra o HBsAg e assim suprimir a replicação do vírus, reduzir a carga viral²⁴. Por outro lado, esta vacina também parece ser capaz de eliminar o HBeAg e melhorar a taxa de conversão do HBeAg / HBeAb, não apenas em pacientes com altos níveis séricos de ALT, mas também naqueles com níveis normais^{16,24}. A seroconversão de HBeAg é um indicador importante da inibição da replicação do VHB¹²². Assim, a vacina DCs parece causar uma redução rápida, estável e permanente da carga viral²². No entanto, estes são estudos com um pequeno número de doentes e por conseguinte têm limitações que afetam a interpretação dos resultados^{16,24}.

Um ensaio clínico de fase I mais robusto foi realizado na China, e publicado em 2009, onde DCs pulsadas com o peptídeo HBcAg18-27 e o peptídeo Pre-S244-53 (e não com o HBsAg) foram administradas duas vezes por mês, durante os primeiros 3 meses, e uma vez por mês durante os 3 meses seguintes, a 380 pacientes com HBC²². Após 2 meses de tratamento com as DCs, o número de células T CD8 + aumentou pelo menos 10 % em 28 pacientes, confirmando a função imunoestimuladora desta vacina²². Após 48 semanas de tratamento, 55 pacientes perderam o HBeAg, 40 seroconverteram o HBeAg em HBeAb, sugerindo que esta vacina inibe a replicação do VHB, 20 ficaram HBsAg negativos e 5 seroconverteram o HBsAg em anticorpos anti-HBsAg, sugerindo que a vacina de DCs ativa as células T CD4+ e estimula a imunidade humoral²². Também foi observado um efeito na normalização da ALT à 48ª semana e o ADN do VHB tornou-se indetetável em 46,36 % dos pacientes HBeAg negativos, sugerindo que esta vacina promove a diminuição da carga viral²².

Atualmente está a ser desenvolvido um ensaio clínico de fase I/2 no Terceiro na China (NCT0193635 e NCT02615639) com o objetivo de avaliar a viabilidade de DCs pulsadas com HBsAg combinado com outros antivirais como o INF-peguilado e Nucleósidos em 450 indivíduos com HBC²⁶. O ensaio clínico encontra-se ainda a recrutar voluntários²⁶.

Tabela 3: Ensaios Clínicos com DCs-Vacina pulsada com antígenos do VHB

Nome	Célula	Fase	Nº	Local	LT Específicos	Conversão HBeAg / HBeAb	Anticorpos anti-HBsAg	ALT	Carga Viral (ADN-VHB)	Ref
Vacina DCs	Células dendríticas carregada com HBsAg	Fase I (2003)	5 Pacientes saudáveis	Japão	–	–	Aumento dos anticorpos anti-HBsAg em 2 voluntários positivos para anticorpos anti-HBsAg (vacina profilática) e em 2 negativos	–	–	13
Vacina DCs	Células dendríticas carregada com HBsAg	Fase I (2010)	5 Pacientes com HBC	Japão	Imunidade celular específica para o HBsAg em um paciente.	–	Presença de anticorpos anti-HBsAg em 2 pacientes	Não houve alteração significativa nos níveis séricos de ALT	Diminuiu ligeiramente.	24
Vacina DCs + Lamivudine	Células dendríticas carregada com HBsAg	Fase I (2005)	19 Pacientes com HBC	China	–	5 Seroconverteram o HBeAg em HBeAb	–	7 casos HBeAg pos. e 4 HBeAg neg. apresentaram normalização da ALT	11 de 19 tiveram resposta clínica à vacina, com diminuição do ADN-VHB	16,19
Vacina DCs	Células dendríticas carregada com peptídeos virais	Fase I (2009)	380 Pacientes com HBC	China ChiCTR-TNRC-00000560	Após 2 meses o número de células T CD8 + aumentou em pelo menos 10% em 28 pacientes	Dos 185 pacientes HBeAg positivos, 55 perderam o HBeAg e 40 seroconverteram o HBeAg em HBeAb à 48ª semana	Dos 195 pacientes HBeAg negativos 5 converteram o HBsAg em anticorpos anti-HBsAg	Normalização significativa da ALT em ambos os pacientes HBeAg positivos e negativos	ADN do VHB tornou-se indetetável em 46,36% dos pacientes HBeAg neg. e em 3,13% dos pacientes HBeAg pos.	22
HPDC-T	Células dendríticas carregada com HBsAg	Fase I/II (a recrutar)	450 Pacientes com HBC	China NCT01935635 NCT02615639	–	–	–	–	–	26

Vantagens e limitações da DCs-vacina

As células dendríticas possuem uma extraordinária capacidade de capturar e processar antígenos e têm tudo o que é necessário para ativar as células T específicas, incluindo altos níveis do MHC, moléculas co-estimulatórias e moléculas de adesão (tabela 4)^{27, 28}. Assim, esta imunoterapia baseada em DCs tem uma significativa capacidade de induzir imunidade específica^{27, 28}.

O desenvolvimento de novas técnicas laboratoriais permitiu que, atualmente, seja possível gerar em laboratório, um grande número de células dendríticas funcionais provenientes de monócitos do sangue periférico de um paciente, tornando esta terapia mais viável²⁸. No entanto, a produção é cara, com alto risco de contaminação e morosa, pelo que as DCs são normalmente produzidas e criopreservadas depois de produzidas^{20,27}. Por outro lado, o desenvolvimento da vacina é um procedimento intensivo e individualizado para cada paciente e, apesar de ser uma opção com elevada especificidade, necessita de múltiplos procedimentos para controlo da qualidade do produto^{23,27}. A inexistência de protocolos standardizados traduz-se na produção de vacinas onde a qualidade do produto difere de local de produção, do procedimento e paciente, o que dificulta a reprodutibilidade desta abordagem imunoterapêutica^{20,23}.

Um dos maiores obstáculos desta terapia deriva da ineficiente migração das DCs do local de administração para os gânglios linfáticos, levando a uma possível permanência das DCs no local da injeção, sendo que apenas um pequeno número migra para os nódulos linfáticos^{20,29}. Por outro lado, o ambiente imunossupressor associado à doença pode inativar os linfócitos T ativos pela vacinação, diminuindo a eficácia clínica deste tratamento^{20,27,29}. Assim, para ultrapassar este problema são necessárias várias doses de vacinação de forma a manter os níveis de linfócitos T elevados, no entanto, como esta vacina é administrada por via injetável torna-se uma opção menos apreciada pelos pacientes^{20,27,29}.

Tabela 4: Vantagens e Limitações da DCs-Vacina.

Vantagem	Limitações
DCs são APC de excelência.	Produção cara, com risco de contaminação e morosa.
Significativa capacidade de induzir imunidade.	Múltiplos procedimentos de controlo da qualidade.
Possibilidade de obtenção de DCs <i>ex vivo</i> .	Inexistência de protocolos standardizados.
Alta especificidade.	Má distribuição das DCs.
	Ambiente imunossupressor associado à doença pode inativar os linfócitos T.
	Via injetável e alta frequência de administração.

Conclusão da DCs-vacina

A imunoterapia celular com DCs autólogas pulsadas com HBsAg ou com outros peptídeos virais é segura e bem tolerada no tratamento da HBC e consegue, através da indução de respostas imunes específica no doente, nomeadamente LT CD8+ e LT CD4+ específicos, reduzir a replicação do vírus, melhorar a taxa de seroconversão do HBeAg, reduzir a carga viral e aumentar os anticorpos anti-HBsAg, tanto em pacientes com elevados níveis séricos de ALT como com baixos^{13,16,24}. As terapias antivirais tradicionais usadas para tratar a HBC, como o interferão e a lamivudina, são mais eficazes em pacientes com ALT elevada e replicação ativa, pelo que, a imunoterapia utilizando DCs, pode ajudar pacientes com HBC com baixos níveis de ALT²². A co-aplicação da vacina DCs e outros fármacos pode aumentar a sua capacidade de resposta e ter efeitos mais rápidos na eliminação do VHB¹⁶.

Apesar de o método de produção destas vacinas ser caro, com elevado risco de contaminação e moroso a vacina é considerada segura não apresentando efeitos colaterais¹⁶. Desta forma, esta vacina torna-se um método imunoterapêutico biológico com uma boa perspectiva de aplicação¹⁶. No entanto, é importante referir que os ensaios clínicos referidos acima já foram realizados há mais de uma década, e apresentam algumas limitações que afetam a interpretação dos resultados apresentados, nomeadamente, incluir poucos voluntários, poucas administrações da vacina ao longo dos estudos e deficiente avaliação da resposta imunológica à vacina²⁴. Assim sendo, mais investimentos em ensaios clínicos atualizados e mais completos são necessários.

3.2. Vacinas terapêuticas de linfócitos T modificados

Aplicação na HBC

As células T específicas para o VHB são determinantes para eliminar o vírus no contexto da infeção por VHB³⁰. A extrema raridade das células do SI específicas para o VHB em pacientes HBC, as alterações metabólicas e, em consequência, a dificuldade de aumentar a imunidade específica para o VHB estimularam o desenvolvimento de estratégias de restauração imune baseadas na transferência de células T modificadas e específicas para o VHB^{31,32}. Num estudo pacientes com leucemia e infeção crónica pelo VHB receberam um transplante de medula óssea de indivíduos com uma resposta de células T específicas para VHB, (indivíduos vacinados com VHB ou indivíduos que controlaram espontaneamente a infeção pelo VHB) levando à clearance do VHB, nesses pacientes^{31,33}. Estes dados suportam a

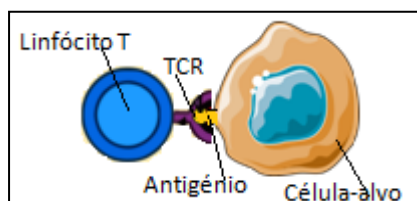
hipótese de que a transferência adotiva direta de células T específicas para o VHB em pacientes com HBC pode levar ao controlo do VHB³¹.

Efetivamente, a utilização de vacinas terapêuticas com LT, geneticamente modificados para expressar recetores específicos do VHB, como o recetor de antígeno quimérico (CAR) ou o recetor de células T (TCR), pode, ajudar a aumentar o número de células T específicas para o VHB, em pacientes com HBC³⁰. Até hoje, dois tipos de vacinas de linfócitos T foram estudadas para tratar a HBC - as vacinas de linfócitos T TCR e as vacinas de linfócitos T CAR- que irão ser abordadas na segunda parte deste trabalho de revisão.

Vacina de Linfócitos T TCR

A imunoterapia baseada em células T modificadas com um TCR, com especificidade pré-definida foi inicialmente estudada para o tratamento do cancro e é baseada na expressão transgénica do TCR em células T autólogas de pacientes com cancro, resultando em células T geneticamente modificadas que exibiam uma nova especificidade para antígenos do cancro³⁰. Tendo isto em conta, diversos investigadores têm estudado a hipótese desta imunoterapia ser capaz de controlar infeções virais como a HBC³⁰.

O TCR é uma proteína heterométrica constituída por cadeias α e β variáveis, associadas a moléculas sinalizadoras diméricas invariáveis³⁰. Após injeção das células T autólogas modificadas, as cadeias variáveis reconhecem o antígeno expresso na superfície das



células alvo, como ilustrado na figura 5, enquanto as cadeias invariáveis propagam o sinal, promovendo a ativação dos linfócitos T e a libertação de citocinas que consequentemente lisam a célula alvo³⁰.

Figura 5: Acoplamento do TCR do LT ao antígeno da célula alvo.

Efetivamente, a transferência adotiva de células T, manipuladas a expressar um recetor de células T (TCR) específico para um antígenos do VHB pode suplementar respostas imunes específicas em pacientes com HBC e assim, facilitar o controlo do VHB³⁵. Um conjunto de investigadores de vários centros de investigação localizados em Singapura e na Alemanha, juntamente com a empresa Lion TCR, desenvolveram um estudo pré-clínico, para avaliar a utilização desta imunoterapia baseadas em células T TCR para o tratamento da HBC, publicado em 2017^{35,36}. Este estudo demonstrou que a eletroporação de RNAm do TCR específico para o VHB para células T gera células T específicas para o VHB capazes de reconhecer, inibir e lisar células hepatócitos infetados *in vitro* e que administrações repetidas

dessas células T induzem uma redução imunomediada, progressiva e controlada das cargas virais do VHB³⁵.

No entanto, esta tecnologia, apesar de poder ser amplificada para números substanciais ex-vivo, pode desencadear a proliferação desenfreada de células T e uma excessiva libertação de citocinas, levantando a preocupações de segurança que impediram o teste dessa abordagem em pacientes^{30,37}. Por outro lado, a maioria das células-alvo, mostra defeitos no processamento e apresentação de antígenos pelo MHC, tornando-se invisíveis para o reconhecimento do TCR³⁷. Para evitar isto, uma nova abordagem, que se baseia na obtenção de células T autólogas com recetores de antígenos quiméricos (CAR) direcionados contra HBsAg foi desenvolvida^{32,38}. Estas células têm uma especificidade pré-definida e são capazes de reconhecer especificamente alvos infectados independentemente do MHC^{38,32}. Efetivamente, a terapia com células T adotivas usando recetores CAR obteve maior sucesso clínico do que usando o TCR³⁰.

Vacina de Linfócitos T CAR

I. Aplicação no cancro e potencial aplicação na HBC

A terapia com células T CAR já tratou com sucesso alguns cancros³⁰. Tendo isto em consideração, tem aumentando o interesse na sua aplicação em doenças virais crónicas, na medida em que pretende redirecionar células T citotóxicas para células infectadas por vírus como por exemplo, o vírus da imunodeficiência humana-I e o VHB³². Dados em modelos animais têm sido encorajadores, mostrando a capacidade dessas células em reconhecer hepatócitos contaminados com o VHB e induzir a redução do HBsAg^{31,32,38}.

II. Mecanismo de ação e preparação da vacina LT-CAR

As células T CAR são células T (CD4+ e CD8+) recolhidas do doente e posteriormente, submetidas a reprogramação genética, de modo a possuírem um recetor específico na sua superfície, o CAR³¹. O seu uso pretende colmatar a ineficácia imunitária ao assegurar um reconhecimento antigénico independente de apresentação pelo MCH³¹. A preparação *in vitro* destas células para o tratamento da HBC tem por base os mesmos princípios usados na preparação destas células no tratamento do cancro³². Inicialmente é necessário obter células T do paciente com HBC, através de leucaferese de células mononucleares do sangue periférico, conforme ilustrado na figura 6³². Depois essas células são submetidas a uma reprogramação genética ex vivo, de modo a possuírem um recetor

específico na sua superfície, o CAR, ou seja, promove-se a transferência de genes para a célula T, com informação para produzir um CAR específico na sua superfície³².

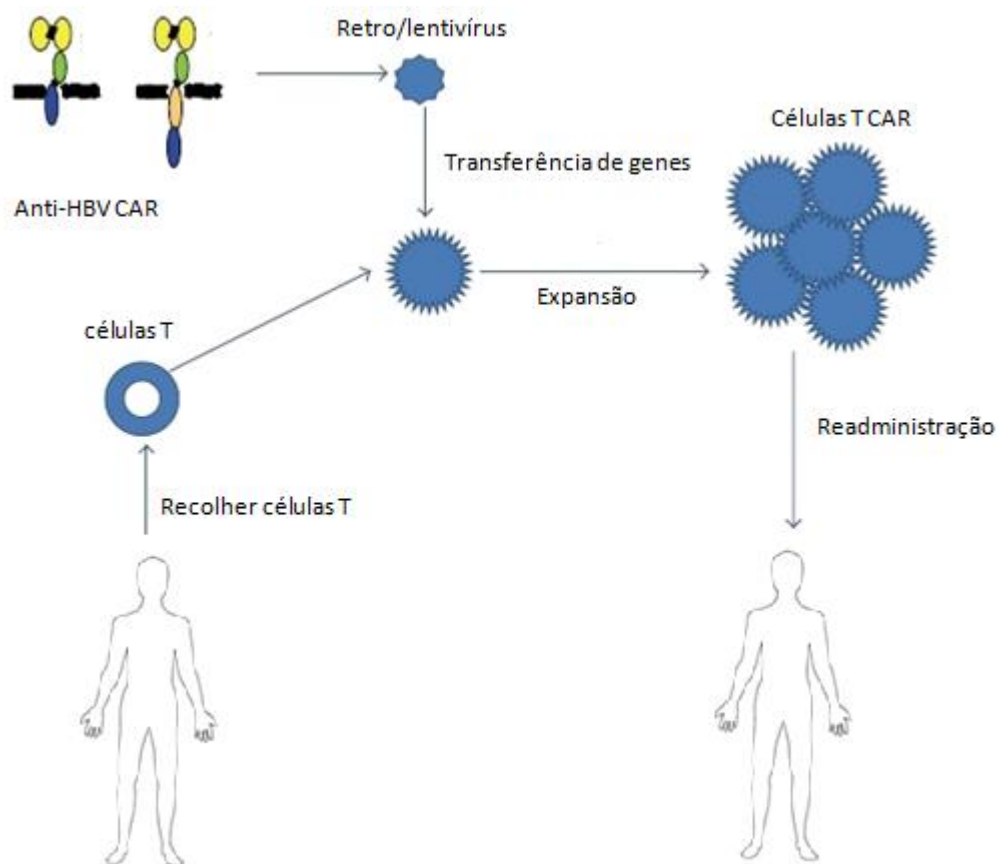
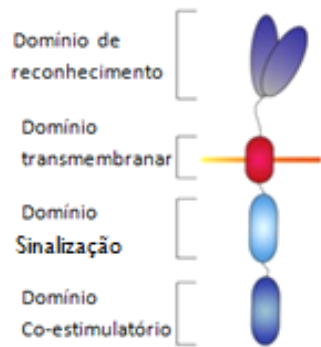


Figura 6: As diversas etapas da produção das células T CAR. Adaptado^{30,32}.

Este gene CAR pode ser inserido no genoma das células T (transdução) através de vetores retrovirais ou lentivirais³². O método de transdução mais aconselhável ainda não foi estabelecido³². As células T são amplificadas em laboratório para números terapêuticos e depois re-administradas ao paciente por infusão IV, conforme ilustrado na figura 6³². Após a infusão das células T CAR, estas multiplicam-se, ocorre expressão retroviral e os CARs oferecem às células T humanas primárias especificidade ao VHB, permitindo o reconhecimento específico do antígeno do VHB³². Após este reconhecimento ocorre a ativação das células T modificadas e estas começam a libertar citocinas pró-inflamatórias e antivirais originando uma resposta citotóxica intensa, que leva à citólise das células infetadas com o VHB, independentemente do complexo principal de histocompatibilidade³².

III. O recetor de antigénio quimérico e a sua classificação



O recetor de antigénio quimérico (CAR) é um polipéptido quimérico independente do MHC, constituído por um domínio de reconhecimento, um espaçador, um domínio transmembranar e um domínio intracelular, conforme ilustrado na figura 7³⁹.

Figura 7: CAR. Adaptado ³⁰

O domínio de reconhecimento é um fragmento extracelular variável de cadeia simples (scFv) que é um fragmento de anticorpo expresso na superfície da célula T, que reconhece o antigénio alvo e confere especificidade antigénica^{39,40}. Hoje em dia, os fragmentos de anticorpos são obtidos por engenharia genética³⁹. O espaçador faz a ligação entre a porção alvo e o domínio transmembranar⁴⁰. O domínio transmembranar liga o domínio extracelular ao domínio intracelular atravessando a membrana celular, permitindo a expressão do CAR na superfície da célula⁴⁰. O domínio intracelular permite classificar as células T CAR em primeira, segunda e terceira geração, como demonstrado da figura 8⁴⁰.

A primeira geração de células T CAR é constituída por um scFv e o domínio de sinalização, pelo que não há co-estimulação^{32,39}. Por essa razão, a ativação e a proliferação das células T é limitada, e portanto, leva a uma ação curta e de baixa eficácia^{41,42}. Para dar resposta a isto, foi criada uma segunda geração que contém uma molécula co-estimuladora, no seu domínio intracelular que estimula a produção de citocinas^{39,40}. Esta geração demonstrou uma maior ativação, expansão, persistência e crescimento das células T^{41,42}. Mais tarde, de forma a aumentar a eficácia surgiu ainda uma terceira geração que contém duas moléculas co-estimuladoras, aumentando a ativação, a proliferação e a sobrevivência das células T³⁹.

Independentemente da geração, após o acoplamento do antigénio alvo com o domínio extracelular do CAR, o endodomínio de sinalização inicia a ativação da célula T, resultando numa amplificação das células T, secreção de citocinas pró-inflamatórias e lise daquelas células que expressam o antigénio alvo na superfície celular³².

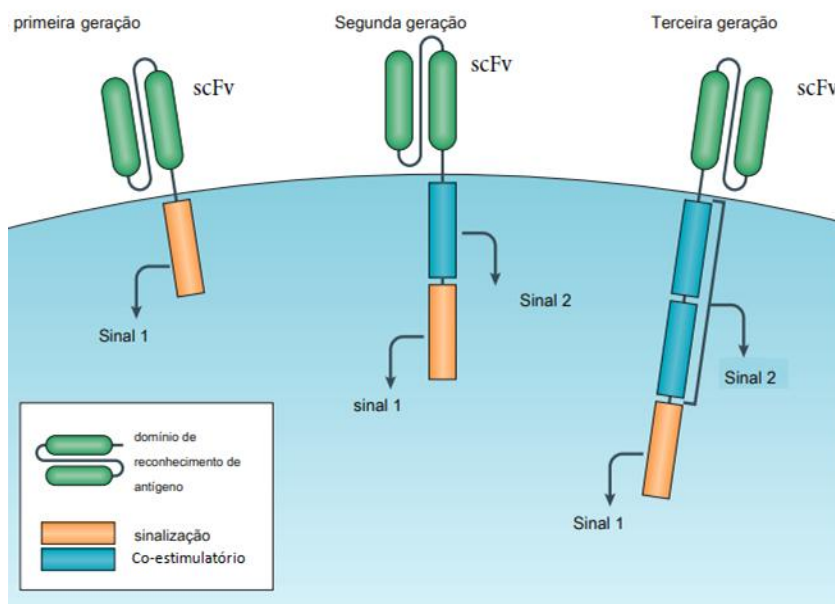


Figura 8: Designs CAR: contêm um domínio de reconhecimento e um domínio de sinalização que fornece o sinal 1 para ativar os LT. Em CARs de segunda e terceira geração é adicionado um ou dois domínios de sinalização co-estimulatórios, respectivamente, que fornecem o sinal 2. Adaptado³⁹

IV. Estudos

Num estudo realizado na Alemanha, células T manipuladas com dois CARs direcionados contra dois diferentes antígenos de superfície do VHB, o L-proteína e o S-proteína, foram estudados *in vitro*³². O reconhecimento de antígenos pelas células T CAR resultou na secreção abundante de $\text{INF-}\gamma$ *in vitro*, que controla a replicação do VHB e tem efeito antiviral³². Após combinar o domínio de sinalização do CAR com uma porção co-estimuladora num CAR de segunda geração, a secreção de IL-2 foi adicionalmente induzida, fornecendo uma ativação completa das células T³². As células T CAR anti-S e anti-L tiveram eficiências semelhantes, e lisaram *in vitro* células replicantes do VHB e hepatócitos humanos primários infectados com VHB³². No entanto, os níveis de citocinas, particularmente de IL-2, foram mais elevados nas células T marcadas com o CAR anti-S³². Esta diferença é provável que seja devido à elevada abundância da proteína S expressa e subsequentemente apresentada na superfície de células infectadas com o VHB³².

Noutro estudo realizado na Alemanha, foram usados como alvos hepatócitos humanos primários infectados com o VHB³⁸. O tratamento baseava-se num conjunto de células T primárias do mesmo dador manipuladas com CAR anti-S e anti-L³⁸. Após o acoplamento do antígeno presente nos hepatócitos infectados pelo VHB com as células T CAR, os hepatócitos infectados com VHB foram eliminados, uma vez que mais de 95 % e 80 % do ADN do VHB foi eliminado das culturas de hepatócitos infectados com VHB pelas células T manipuladas com anti-S CAR e com anti-L CAR, respetivamente³⁸. Assim sendo, em conjunto estes resultados argumentam fortemente para a eficácia desta vacina na eliminação específica de hepatócitos infectados pelo VHB³⁸.

V. Vantagens e limitações dos CAR

Devido ao seu *design* e à sua composição modular, esta tecnologia melhorou substancialmente o redirecionamento das células T CD4+ e CD8+ para alvos específicos, combinando diferentes vantagens³². A principal vantagem é que ao contrário dos TCR os CARs não são restritos ao MHC, reconhecendo assim antígenos não necessariamente apresentados pelo MHC³². As células T CAR podem, desse modo, reconhecer células com mecanismos de escape imune estabelecidos e alvos que são compartilhados por muitos indivíduos independentemente do MHC tendo portanto uma ampla variedade de alvos³².

Apesar de promissora, esta tecnologia ainda apresenta várias dificuldades uma vez que, a produção de grandes quantidades de células T CAR ainda é difícil, estritamente regulada, requer um laboratório com pessoal altamente qualificado e com capacidade para fazer engenharia individual de células T para cada paciente^{19,32}. Por outro lado, a expansão de células T *in vitro* parece reduzir a sua reatividade e as células T CAR persistem durante um curto prazo de tempo *in vivo*, o que torna esta tecnologia falível e de difícil implementação clínica³².

VI. Perguntas abertas sobre o uso clínico de células T CAR na HBC

Embora do desempenho *in vitro* de células T CAR seja promissor, esta imunoterapia aplicada ao tratamento da HBC é ainda primordial e portanto, existem várias questões de segurança e eficácia que devem ser consideradas antes da sua implementação clínica³⁸.

A deslocação de células T para o local da infeção determinará o sucesso clínico da terapia com células T adotivas^{32,38}. Efetivamente, durante a primeira circulação da vacina pelo corpo, as células T CAR provavelmente passarão pelo fígado, no entanto, será que se irão infiltrar no tecido e matar hepatócitos infetados^{32,38}? Se sim, em que extensão os hepatócitos infetados pelo VHB são eliminados *in vivo* pelas células T CAR anti-VHB³²? A ligação das células T CAR anti-VHB a células infetadas pelo VHB aprisionará essas células T localmente no fígado³²?

Adicionalmente é preciso explorar como é que as células T CAR diferenciam os hepatócitos infetados das células vizinhas não infetadas, que podem ligar as partículas do VHB à sua superfície^{32,38}. Ou será que as células T CAR podem causar a morte inespecífica de células não infetadas da vizinhança³⁸? Também é necessário perceber que efeito teria o HBsAg circulante ou partículas subvirais ou solúveis de VHB sobre a ativação de células T CAR³².

Além disso, os hepatócitos no fígado inflamado podem ser mais sensíveis à citólise podendo provocar sérios danos no fígado. Assim parece razoável considerar esta terapia após a diminuição da replicação do VHB com uma terapia antiviral. No entanto, permanece em

aberto se o ambiente imunossupressor característico da doença, não inativa os linfócitos T-CAR da vacina^{32,38}.

Assim, são necessários mais estudos pré-clínicos em animais e subsequentes ensaios clínicos para desvendar estas questões e determinar se a ativação específica de células T CAR pode, efetivamente, estabelecer o controle imunológico da infecção por VHB³². Efetivamente, a utilização de vacinas terapêuticas com LT geneticamente modificados para expressar recetores específicos do VHB, como o CAR ou o TCR para o tratamento da HBC é uma terapia promissora³⁰. Dados em modelos animais têm sido encorajadores, mostrando que essas células têm capacidade de reconhecer e eliminar hepatócitos contaminados com o VHB³¹. No entanto, esta terapia com LT- CAR pode causar danos no fígado e como ainda existem algumas questões de segurança sobre a utilização desta terapia que não foram respondidas, mais estudos pré-clínicos e clínicos são necessários antes da sua implementação clínica³⁸.

4. Conclusão

A HBC é caracterizada pela persistência a longo prazo do VHB associada a uma fraca ou indetetável resposta imune, que provoca exaustão do SI, nomeadamente dos LT, e lesão hepática³. Desta forma, a utilização de imunoterapias que fortaleçam o SI, parecem ser a chave para a depuração do vírus e a cura⁷. Atualmente ainda não existem imunoterapias aprovados para o tratamento da HBC, no entanto, várias hipóteses já estão a ser estudadas, nomeadamente, as vacinas terapêuticas de ADN, as vacinas terapêuticas proteicas, as terapias celulares, os agonistas TLR e os *immuno checkpoint inhibitors*⁸. Neste trabalho de revisão foram apresentadas as vacinas terapêuticas celulares ou terapias celulares para o tratamento da HBC, onde determinadas células são retiradas dos doentes, trabalhadas *ex vivo* e re-administradas⁷. Para o tratamento da HBC, existem duas abordagens desta terapia celular: as constituídas por DCs pulsadas com antigénios específicos do VHB e as constituídas por LT com recetores específicos para antigénios do VHB. Ambas parecem ser imunoterapias promissoras para reestabelecer o SI na HBC, na medida em que colmatam a limitação da exaustão de LT específicos para o VHB e assim, juntamente com antivirais já existentes consegue eliminar o vírus e os hepatócitos infetados com cccDNA garantindo a cura⁷. No entanto, o número de estudos publicados ainda não permite ter uma opinião sólida e bem argumentada sobre a utilização das vacinas celulares no tratamento da HBC, pelo que são necessários mais investimentos na investigação desta terapia⁷. Por outro lado, o desenvolvimento de um tratamento individualizado a grande escala ainda é um problema, dado o alto custo e os complexos requisitos para a sua produção e aplicação¹⁹.

Efetivamente, com os avanços científicos que esta imunoterapia baseada em células autólogas já conquistou para o tratamento de alguns cancros, é expectável, combinando esta terapia com outras abordagens promissoras, alcançar o controlo global do vírus da hepatite B em meados deste século⁴. No entanto, mais investigação sobre a aplicação clínica desta imunoterapia em doentes com HBC é necessária.

5. Bibliografia

1. YUN-FAN, L.; CHU, C. - Hepatitis B virus infection. *The Lancet*. 373:9663 (2009) 582-592.
2. LEGNANI, C.; POLI, D.; PALARETI, G.; COSMI, B.; TOSETTO, A.; TESTA, S.; ANTONUCCI, E.; ERBA, N. - Immune balance in Hepatitis B Infection: Present and Future Therapies. *International Journal of Laboratory Hematology*. 38:1 (2015) 42-49.
3. CHANG, J.; LEWIN, S. R. - Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Gastroenterology Clinics of North America*. 85:1 (2007) 16-23.
4. LIN, C. L.; KAO, J. H. - Review article: novel therapies for hepatitis B virus cure – advances and perspectives. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 44:3 (2016) 213-222.
5. LIANG, T. J.; BLOCK, T.; MCMAHON, B.; GHANY, M; URBAN, S; GUO, J; LOCARNINI, S; ZOULIM, F; CHANG, K; LOK, A - Present and Future Therapies of Hepatitis B: From Discovery to Cure. *Hepatology*. 62:1 (2015) 1893-1908.
6. JUNG, M. C.; PAPE, G. R. - Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infectious Diseases*. 2:1 (2002) 43-50.
7. SORIANO, V.; BARREIRO, P.; BENITEZ, L.; PEÑA, J. M.; MENDOZA, C.- New antivirals for the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 26:7 (2017) 843-851.
8. MANZOOR, S.; SAALIM, M.; IMRAN, M.; RESHAM, S.; ASHRAF, J.L. - Hepatitis B virus therapy: What's the future holding for us? *World Journal of Gastroenterology*. 21:44 (2015) 12558-12575.
9. ZHANG, E.; KOSINSKA, A.; LU, M.; YAN, H.; ROGGENDORF, M. - Current status of immunomodulatory therapy in chronic hepatitis B , fifty years after discovery of the virus : Search for the “ magic bullet ” to kill cccDNA. *ANTIVIRAL RESEARCH*. 123:1 (2015) 193-203.
10. SANDHU, P.; HAQUE, M.; HUMPHRIES-BICKLEY, T.; RAVI, S.; SONG, J. - Hepatitis B virus immunopathology, model systems, and current therapies. *Frontiers in Immunology*. 8:436 (2017) 1-10.
11. TSAI, K. N.; KUO, C. F.; OU, J. H. J. - Mechanisms of Hepatitis B Virus Persistence. *Trends in Microbiology*. 26:1 (2018) 33-42.

12. TANG, L. S. Y.; COVERT, E.; WILSON, E.; KOTTILIL, S. - Chronic Hepatitis B infection a review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 319:17 (2018) 1802-1813.
13. FAZLE AKBAR, S. M.; FURUKAWA, S.; ONJI, M.; MURATA, Y.; NIYA, T.; KANNO, S.; MURAKAMI, H.; HORIIKE, N. - Safety and efficacy of hepatitis B surface antigen-pulsed dendritic cells in human volunteers. *Hepatology Research*. 29:3 (2004) 136-141.
14. BERTOLETTI, A.; FERRARI, C. - Adaptive immunity in HBV infection. *Journal of Hepatology*. 64:1 (2016) S71-S83.
15. REHERMANN, B.; BERTOLETTI, A. - Immunological aspects of antiviral therapy of chronic hepatitis B virus and hepatitis C virus infections. *Hepatology*. 61:2 (2015) 712-721.
16. CHEN, M.; LI, Y.; ZHANG, D.; WANG, Z.; ZENG, W.; SHI, X.; GUO, Y.; GUO, S.; REN, H. - Therapeutic effect of autologous dendritic cell vaccine on patients with chronic hepatitis B: a clinical study. *World journal of gastroenterology*. 11:12 (2005) 1806-1808.
17. MCMAHON, B. - Natural history of chronic hepatitis B - clinical implications. *Medscape journal of medicine*. 10:4 (2008) 91-97.
18. TSENG, T. C.; HUANG, L. R. - Immunopathogenesis of Hepatitis B Virus. *Journal of Infectious Diseases*. 216:8 (2017) S765-S770.
19. LI, J.; LI, J.; BAO, M.; GE, J.; REN, S.; ZHOU, T.; QI, F.; PU, X.; DOU, J. - Research progress of therapeutic vaccines for treating chronic hepatitis B. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 13:5 (2017) 986-997.
20. CONSTANTINO, J.; GOMES, C.; FALCÃO, A.; CRUZA, M.; NEVES, B. - Antitumor dendritic cell-based vaccines: lessons from 20 years of clinical trials and future perspectives. *Translational Research*. 168:1 (2015) 74-95.
21. DAWOOD, A.; ABDUL BASIT, S.; JAYARAJ, M.; GISH, R. G. - Drugs in Development for Hepatitis B. *Drugs*. 77:12 (2017) 1263-1280.
22. LUO, J.; LI, J.; CHEN, L.; NIE, L.; HUANG, J.; LIU, W.; LUO, L.; YAN, X. J. - Autologous dendritic cell vaccine for chronic hepatitis B carriers: A pilot, open label, clinical trial in human volunteers. *Vaccine*. 28:13 (2010) 2497-2504.
23. TACKEN, P. J.; DE VRIES, I.; JOLANDA, M.; TORENSMA, R.; FIGDOR, C. G. - Dendritic-cell immunotherapy: From ex vivo loading to in vivo targeting. *Nature Reviews Immunology*. 7:10 (2007) 790-802.

24. AKBAR, S. M. F.; FURUKAWA, S.; HORIIKE, N.; ABE, M.; HIASA, Y.; ONJI, M. - Safety and immunogenicity of hepatitis B surface antigen-pulsed dendritic cells in patients with chronic hepatitis B. *Journal of Viral Hepatitis*. 18:6 (2011) 408-414.
25. OLIVEIRA, T. G.; BORGES, O.; CRUZ, M. T. - Anti-tumor immunotherapy dendritic cells. *Acta Farmacêutica Portuguesa*. 2:2 (2013) 105-119.
26. KOSINSKA, A. D.; BAUER, T.; PROTZER, U. - Therapeutic vaccination for chronic hepatitis B. *Current Opinion in Virology*. 23:1 (2017) 75-81.
27. WEN, Y.; WANG, X.; WANG, B.; YUAN, Z.. - Vaccine therapies for chronic hepatitis B: Can we go further? *Frontiers of Medicine in China*. 8:1 (2014) 17-23.
28. ARMSTRONG, A.; EATON, D.; EWING, J. - Cellular immunotherapy for cancer. *BMJ (Clinical research ed.)*. 323:7324 (2001) 1289-1293.
29. TURNIS, M. E.; ROONEY, C. M. - Enhancement of dendritic cells as vaccines for cancer. *Immunotherapy*. 2:6 (2010) 847-862.
30. ALIENDO, F.; DUKHINOVA, M.; SICILIANO, V. - Engineered Cell-Based Therapeutics: Synthetic Biology Meets Immunology. *Front Bioeng Biotechnol*. 7:43 (2019) 1-8.
31. BERTOLETTI, A.; TAN, A. T.; KOH, S. - T-cell therapy for chronic viral hepatitis. *Cytotherapy*. 19:11 (2017) 1317-1324.
32. PROTZER, U.; ABKEN, H. - Can Engineered “Designer” T Cells Outsmart Chronic Hepatitis B? *Hepatitis Research and Treatment*. 2010:1 (2010) 1-9.
33. ILAN, Y.; NAGLER, A.; ADLER, R.; NAPARSTEK, E.; SLAVIN, S.; BRAUTBAR, C.; SHOUVAL, D. - Adoptive transfer of immunity to hepatitis B virus after T cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Hepatology*. 18:2 (1993) 246-252.
34. LOGGI, E.; BIHL, F.; CHISHOLM, J. V.; BISELLI, M.; BONTADINI, A.; VITALE, G.; ERCOLANI, G.; GRAZI, G. L.; PINNA, A. D.; BERNARDI, M.; BRANDER, C.; ANDREONE, P. - Anti-HBs re-seroconversion after liver transplantation in a patient with past HBV infection receiving a HBsAg positive graft. *Hepatology*. 50:3 (2009) 625-630.
35. KAH, J.; KOH, S.; VOLZ, T.; CECCARELLO, E.; ALLWEISS, L.; LÜTGEHETMANN, M.; BERTOLETTI, A.; DANDRI, M. - Lymphocytes transiently expressing virus-specific T cell receptors reduce hepatitis B virus infection. *Journal of Clinical Investigation*. 127:8 (2017) 3177-3188.
36. Lion TCR- Pipeline - [Acedido a 25 de Maio de 2019]. Disponível em:

liontcr.com/pipeline/

37. ESHHAR, Z. - The T-body approach: redirecting T cells with antibody specificity. Handbook of Experimental Pharmacology,. 181:1 (2008) 329-342.
38. BOHNE, F.; CHMIELEWSKI, M.; EBERT, G.; WIEGMANN, K.; KÜRSCHNER, T.; SCHULZE, A; URBAN, S.; KRÖNKE, M.; ABKEN, H.; PROTZER, U. - T Cells Redirected Against Hepatitis B Virus Surface Proteins Eliminate Infected Hepatocytes. Gastroenterology. 134:1 (2008) 239-247.
39. JACKSON, H. J.; RAFIQ, S.; BRENTJENS, R. J. - Driving CAR T - cells forward. Nature Publishing Group. 13:6 (2016) 370-383.
40. JUNO THERAPEUTICS - CARs Are Chimeric Antigen Receptors. [Acedido a 9 Maio de 2019]. Disponível em:www.cartcellscience.com/car-t-cell-therapy-design-moa
41. SHA, H.; WANG, D.; YAN, D.; HU, Y.; YANG, S.; LIU, S.; FENG, JI. - Chimaeric antigen receptor T-cell therapy for tumour immunotherapy. Biosci Rep. 37:1 (2017) 1-12.
42. WANG, M.; YIN, B.; WANG, H. Y.; WANG, R. - Current advances in T-cell based cancer immunotherapy. Immunotherapy. 6:12 (2014) 1265-78.

PARTE 2: Relatórios de Estágios Curriculares

2.A. Relatório de Estágio Curricular em Indústria Farmacêutica

2.B. Relatório de Estágio Curricular em Farmácia Comunitária

Abreviaturas

- **Abreviaturas em Português**

AIM - Autorização de introdução no mercado

DCI - Denominação comum internacional

FL - Farmácia Lusitana

I&D - Investigação e Desenvolvimento

INFARMED, I.P - Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM - Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MSRM - Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

- **Abreviaturas em Inglês**

API - Active Pharmaceutical Ingredients (princípio ativo)

BD - Business Development (desenvolvimento de negócio)

CDMO - Contract Development and Manufacturing Organization

CMO - Contract Manufacturing Organization

EMA - European Medicines Agency (agência europeia do medicamento)

FDA - Food and Drug Administration

GTIN - Global Trade Item Number

GMP - Good manufacturing practices (boas práticas de fabrico)

IMS - Information management system (sistema de gestão de informação)

IPD - Intellectual Property Development

SWOT - Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats (forças, fraquezas, oportunidades, ameaças)

PARTE 2: Relatórios de Estágios Curriculares

2.A. Relatório de Estágio Curricular em Indústria Farmacêutica

Orientadora Dr^a. Ana Jerónimo

I. Introdução

As Ciências Farmacêuticas englobam diversas áreas de atuação profissional, nomeadamente, a farmácia de oficina, a farmácia hospitalar, a distribuição grossista, a indústria farmacêutica, o ensino e a investigação científica²¹. A indústria farmacêutica foi uma área que, desde que ingressei no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), me fascinou pela possibilidade de poder contactar com toda a cadeia de valor do medicamento, desde o Investigação e desenvolvimento (I&D) até ao lançamento do produto no mercado¹. Assim sendo, quando me foi dada a possibilidade de estagiar numa indústria farmacêutica não tive dúvidas e decidi propor-me ao desafio escolhendo a Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A como primeira opção. O meu estágio curricular na Bluepharma teve início no dia 7 de janeiro de 2019 e terminou a 29 de março de 2019. Antes de ser aceite como estagiária tive uma entrevista presencial onde expus a minha vontade de fazer um estágio no departamento de Desenvolvimento de Negócio.

A Bluepharma está sediada em São Martinho – Cimo de Fala, Coimbra e surgiu quando, em 2001, um grupo de investidores, adquiriu a unidade industrial da Bayer em Coimbra, que empregava 58 funcionários. Inicialmente era considerada uma *Contract Manufacturing Organization (CMO)*, isto é, trabalhava essencialmente para terceiros, fornecendo somente serviços de indústria¹². Ao longo dos seus 18 anos implementou outras estratégias e, atualmente, para além de fabrico com marca própria ou para terceiros, também faz desenvolvimento de *dossiers* para obtenção de Autorização de Introdução no Mercado (AIM), desenvolvimento de produtos onde oferece serviços de I&D sendo, portanto, considerada uma *contract development and manufacturing organization (CDMO)*^{6,11}. Hoje, o Grupo Bluepharma tem 580 funcionários e produz/comercializa, essencialmente formas sólidas de libertação imediata ou modificada⁴. Também está autorizada a produzir semi-sólidos, líquidos para uso interno, supositórios e produtos de investigação e, também tem capacidades para desenvolver tecnologias avançadas como os injetáveis complexos, filmes e *sprays* orais, *Hot Melting Extrusion* e ainda *Multilayer Technology*^{4,11}.

O presente relatório, apresenta-se sob a forma de uma análise SWOT sigla de *Strengths, Weaknesses, Opportunities e Threats* (Forças, Fraquezas, Oportunidades, Ameaças). Através desta análise farei um balanço do estágio destacando os pontos fortes e fracos (perspetiva interna) do estágio e ainda, as oportunidades e as ameaças (perspetiva externa) que consegui extrair desta experiência.

2. Desenvolvimento de negócio

O departamento de desenvolvimento de negócio (BD) é um dos vários departamentos que fazem parte da Bluepharma⁶. Este departamento faz o primeiro contacto com outras empresas com o objetivo de fechar negócios promissores representando, assim, a “locomotiva” da empresa⁶. Os principais modelos de negócio no BD englobam contratos de licenciamento (*Licensing*), contratos de licenciamento e produção (*Licensing and Supply*), contratos de produção, contratos de distribuição, contratos de desenvolvimento e contratos de co-desenvolvimento⁶. Para potenciar ao máximo o sucesso dos seus negócios o BD faz periodicamente *Portfolio management*, onde estuda candidatos ao *portfolio* da Bluepharma, de forma a desenvolver uma *pipeline* de produtos atualizada e que responde às necessidades do mercado e da empresa e, ainda, *Market analysis*, onde avalia quais os países/mercados e respetivas empresas mais adequadas à sua oferta e que, portanto, podem ser potenciais clientes para desenvolver negócio⁶.

Os contratos de licenciamento baseiam-se numa *Technology transfer*⁶. São realizados quando uma empresa/cliente quer entrar com um produto num mercado específico, e para isso compra uma licença para utilização do *dossier* desenvolvido ou co-desenvolvido pela Bluepharma, para obtenção de uma AIM em nome próprio, daquele produto, naquele mercado específico⁶. A produção é feita fora da Bluepharma, ou seja, após obtenção da AIM a tecnologia é transferida para o local de fabrico designado pelo cliente⁶.

Os contratos de licenciamento e produção (*Licensing and Supply*) são realizados quando uma empresa/cliente quer entrar com um produto num mercado específico e, para isso, compra uma licença para utilização do *dossier* desenvolvido ou co-desenvolvido pela Bluepharma para obtenção de uma AIM em nome próprio, daquele produto, naquele mercado específico⁶. Após obtenção de uma AIM no mercado desejado a Bluepharma faz o *supply* do produto para esse mercado, ou seja, garante a produção do produto⁶.

Os contratos de produção visam a possibilidade da Bluepharma, dentro das suas capacidades produzir para outra marca. O cliente/parceiro disponibiliza o seu *dossier* para que o fabrico do produto seja realizado pela Bluepharma⁶.

Os contratos de distribuição são realizados em situações em que outras empresas (normalmente distribuidoras) querem entrar no mercado com produtos da marca Bluepharma⁶. Nestes negócios a responsabilidade de registo da empresa e *dossier* é do cliente, mas é a Bluepharma que fica detentora da AIM no território.

Os contratos de desenvolvimento surgem quando um cliente contrata a Bluepharma para desenvolver um produto de raiz⁶. Aqui todos os departamentos estão envolvidos⁶. Os

contratos de co-desenvolvimento, tem em vista o desenvolvimento de um produto em conjunto com outras empresas farmacêuticas (parceiros) com o objetivo de construir um *portfolio* atrativo para os principais mercados da Bluepharma, minimizar risco e ainda partilhas serviços que de outra forma não estariam disponíveis⁶.

3. Análise SWOT

Tal como anteriormente referido, o relatório de Estágio Curricular em Indústria Farmacêutica será apresentado sob a forma de uma análise SWOT.

Tabela 5: Análise SWOT do estágio curricular em Indústria Farmacêutica.



FORÇAS

- **Receção calorosa**

A Bluepharma proporcionou aos estagiários uma excelente receção, com oferta do *kit Welcome Bluepharma*, do Manual de Acolhimento, uma sessão de boas vindas com o Dr. Paulo Barradas (CEO da Bluepharma), um almoço de acolhimento com a equipa do respetivo departamento, um conjunto de formações iniciais sobre a empresa, a sua cultura e funcionamento e, ainda, um programa de tutores para que cada estagiário fosse acompanhado de forma mais próxima e tenha um ponto de apoio mais definido dentro do departamento.

Nas formações iniciais abordaram-se vários temas, nomeadamente, a evolução histórica da Bluepharma, os sistemas de informação, onde foi explicado como funciona a rede interna, o Outlook, o Cisco jabber e o Helpdesk. Também foi introduzido o sistema de gestão integrado, que engloba a investigação, o desenvolvimento, a inovação e ainda, a melhoria contínua que abrange temas como qualidade, ambiente, segurança e saúde no trabalho. Este acolhimento foi crucial para a minha integração na empresa na medida em que me deixou mais confortável, motivada e comprometida com o trabalho que iria desempenhar.

- **Equipa e Ambiente**

No primeiro dia que cheguei à Bluepharma o nervosismo era claro, no entanto, mal conheci a equipa do BD percebi que estava perante uma equipa jovem, com espírito aberto e muito simpática, que me deixou desde logo à vontade. Na primeira semana, fui extremamente bem integrada na equipa e, após me ser explicado o funcionamento do BD, comecei por fazer a reorganização das pastas do reportório de ficheiros do BD e a leitura dos *Generics Bulletin*. Ao longo do estágio realizei várias tarefas relacionadas com o departamento, nomeadamente, análise e apresentação de produtos no âmbito do *Portfolio Management*, análise de mercados, revisão de contratos, elaboração de *Standart Operational Procedure* e ainda, criação de cotações de produtos para enviar a clientes, pelo que, raramente existiram tempos mortos. Também tive oportunidade de participar em várias reuniões internas de BD, em reuniões com a administração e clientes e em várias teleconferências com parceiros. Durante a realização destas tarefas fui percebendo que esta equipa era um exemplo de trabalho, liderança, e de um grande *Know-how* na área. Saliento ainda a disponibilidade oferecida para me contextualizarem e ensinarem sempre que necessitei e ainda, a confiança demonstrada no trabalho que realizei.

- **Melhoria contínua e trabalho de equipa**

O trabalho de equipa e a promoção da melhoria contínua foram 2 pilares que sustentaram este estágio. O departamento de desenvolvimento de negócio (e outros) fazia diariamente, ao início da manhã, reuniões no âmbito do projeto *kaizen* para discutir vários assuntos relacionados com o departamento tais como, o plano de trabalhos, as ações de melhoria a implementar, os indicadores relacionados com as atividades desenvolvidas pelo departamento e outros assuntos pertinentes⁵. A palavra japonesa *Kaizen* significa mudar (“Kai”) para melhor (“zen”) e refere-se a um processo de melhoria contínuo e gradual, conseguida através de pequenos incrementos, sem necessidade de grandes investimento⁵. Estas reuniões tornaram-se fundamentais não só para avaliar o desempenho do departamento

como um todo, mas também para promover o espírito crítico e a criatividade de cada um e, assim, potenciar a eficácia da equipa.

- **Formação contínua**

Devido à enorme oferta e baixa procura o mercado de trabalho está cada vez mais competitivo e exigente, portanto, os profissionais sentem cada vez mais, a necessidade de se especializarem e atualizarem em áreas específicas da sua atividade profissional. A Bluepharma é uma empresa que encara a formação contínua como uma ferramenta de crescimento, na medida em que, torna os seus colaboradores mais preparados para responder às necessidades e desafios da organização³. Assim sendo, ao longo do estágio tive a oportunidade de assistir a várias formações relacionadas com BD e com a empresa, nomeadamente formações intituladas de “Mecanismo de proteção e propriedade intelectual na Indústria Farmacêutica”, “Introdução à produção de medicamentos injetáveis”, “boas práticas de fabrico (GMP)”, “Farmacovigilância” e “Assuntos regulamentares” que me permitiram não só adquirir novos conhecimentos, mas também consolidar conhecimentos já estudados ao longo do meu percurso académico.

- **Contacto internacional**

A indústria farmacêutica caracteriza-se pela constante procura de oportunidades de crescimento e inovação na tentativa de responder às necessidades da população de todo o mundo. Nesta perspetiva, torna-se fundamental a internacionalização das empresas, com destaque para mercados emergentes. A Bluepharma é uma empresa completamente internacionalizada, sendo os seus clientes maioritariamente não portugueses⁶. O departamento de Desenvolvimento de Negócio da Bluepharma contacta diariamente com clientes de todo o mundo e realiza, anualmente, missões a diferentes países⁶. Durante o estágio tive a oportunidade de participar em várias teleconferências com clientes e parceiros internacionais da Bluepharma. Estas reuniões tinham como objetivo discutir negócios *on going*, definir estratégias de negócio ou estabelecer parcerias. Também tive a oportunidade de assistir a reuniões presenciais com clientes que visitaram a Bluepharma para tratar de assuntos relacionados com o *Business*. Além disto, importa destacar que durante os 3 meses acompanhei várias comunicações via *email* com clientes e o progresso dos negócios.

- **Utilização de bases de dados nacionais e internacionais**

O departamento de desenvolvimento negócio tem uma forte componente de pesquisa e análise de dados sobre valor e volume dos mercados⁶. Durante o estágio foram-me dadas

várias tarefas de recolha e apresentação de dados nomeadamente, sobre novos produtos no âmbito do *portfolio management* dos produtos da Bluepharma e sobre vários países e mercados no âmbito do *Market analysis*. Estas tarefas envolveram a consulta e utilização de várias bases de dados, entre elas as mais relevantes foram, o *Intellectual Property Development (IPD) Analytics*, que fornece dados para prever a entrada de novos produtos, a perda de exclusividade, patentes e outros fatores competitivos que podem afetar o posicionamento de um produto no mercado e o seu ciclo de vida, o *Cortellis- Clarivate Analytics*, que reúne uma enorme variedade de dados sobre os produtos e oferece *insights* exclusivos que permitem à empresa ter uma posição competitiva, o ARK, que na mesma perspetiva do *IPD Analytics* permite ter acesso às principais patentes farmacêuticas mundiais, extensões, exclusividades e litigações de um determinado produto^{7,8,9}. Também contactei diariamente com o sistema de gestão de informação (IMS) de vendas e volumes de transações. Para realizar as diversas tarefas que me iam sendo pedidas a consulta das páginas oficiais da *Food and Drug Administration (FDA)*, da Agência Europeia do Medicamento (EMA) e do Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED) era imprescindível.

FRAQUEZAS

- **Trabalho sedentário**

Neste estágio realizei várias tarefas diferentes que contribuíram para a minha formação enquanto futura farmacêutica, pelo que, todos os dias foram diferentes. No entanto, o número de horas em frente ao computador e o estilo de vida mais sedentário, são aspetos que devem ser tidos em conta.

- **Pouco contacto com outros departamentos**

Apesar de este estágio me ter permitido perceber melhor como funciona a organização geral de uma indústria farmacêutica, e que efetivamente, existe uma grande interdependência e coordenação entre os seus departamentos, tive poucas oportunidades de interagir com outros departamentos.

OPORTUNIDADES

- **Adquirir novos conhecimentos e desenvolver competências**

O facto de ter realizado um estágio curricular numa área onde poucos jovens farmacêuticos têm oportunidade de estagiar (desenvolvimento de negócio) torna-se uma vantagem competitiva para entrar no mundo do trabalho, na medida em que me permitiu

adquirir novos conhecimentos, nomeadamente, sobre modelos de negócios e vendas, patentes, propriedade intelectual, análise de mercados farmacêuticos e gestão de produto e pessoas⁶. Também melhorei as minhas aptidões para trabalhar com a ferramenta *Microsoft Excel*[®], uma vez que muito do trabalho desenvolvido passou pela sua utilização e com o *Microsoft Outlook*, pois foi o meio utilizado nas comunicações. Finalmente tive um grande contacto com a língua inglesa, visto que todas as comunicações, pesquisas e apresentações na Bluepharma são feitas em Inglês, o que possibilitou o aprimoramento das minhas competências nesta língua.

- **Integração e aplicação de conhecimentos adquiridos durante o MICF**

Embora os meus conhecimentos sobre “desenvolvimento de negócio” na Indústria farmacêutica fossem limitados, a formação adquirida ao longo do MICF através das unidades curriculares de Assuntos Regulamentares, Gestão e Marketing Farmacêutico, Gestão e Garantia da Qualidade e Organização e Gestão Farmacêutica foram muito úteis para o trabalho que realizei.

- **Compreensão do funcionamento de uma empresa farmacêutica.**

Durante o decorrer do estágio tive a oportunidade de participar em várias formações e reuniões que me permitiram entender melhor a organização e funcionamento da indústria farmacêutica, nomeadamente, quais os setores principais dentro de uma indústria farmacêutica e quais as suas tarefas principais. Para além disso, as tarefas que realizei também me permitiram ter uma melhor perceção do funcionamento do mercado farmacêutico mundial e quais os modelos de negócio que mais se adequam a cada mercado.

- **Promoção das várias saídas profissionais do farmacêutico**

O farmacêutico tem a capacidade e formação necessária para exercer a sua profissão em diversas áreas relacionadas com o medicamento, o que se traduz numa grande vantagem competitiva no mercado de trabalho¹. Apesar do plano de estágios do MICF continuar direcionado para a valência da Farmácia Comunitária, os Alunos do MICF da FFUC tem a excelente oportunidade de fazer estágios noutras áreas relacionadas com o medicamento, nomeadamente, na Indústria Farmacêutica. Estes estágios em muitos dos casos são a “rampa de lançamento” dos jovens farmacêuticos para o mundo do trabalho, permitindo, assim, a sua entrada para outras áreas para além da farmácia comunitária.

AMEAÇAS

- **Conhecimento incompleto em determinadas áreas**

As Ciências Farmacêuticas constituem uma área científica abrangente e multidisciplinar no âmbito das Ciências da Saúde¹⁰. No entanto, o MICF ainda apresenta lacunas em algumas matérias, tais como: modelos de negócios e vendas, mecanismos de proteção na indústria farmacêutica (patentes), propriedade intelectual, análise de mercados farmacêuticos e ainda a nível da gestão de produto, empresas e pessoas. Efetivamente, este ano foi criada uma cadeira opcional de 4º ano sobre “Propriedade Intelectual, Inovação e Empreendedorismo” que colmata as lacunas que referi acima.

- **Subvalorização do Farmacêutico e Concorrência**

Há um desconhecimento geral sobre as competências que o farmacêutico pode desempenhar em algumas áreas na indústria farmacêutica, nomeadamente no desenvolvimento de negócio. Isto abre espaço para outros profissionais desempenharem cargos na indústria farmacêutica, que poderiam ser ocupados por farmacêuticos.

4. Considerações Finais

Foi sem dúvida um grande privilégio estagiar no Departamento de Desenvolvimento de Negócio da Bluepharma. Durante estes 3 meses, foram-me propostos vários desafios que tornaram a minha experiência em indústria muito enriquecedora, que contribui para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Neste estágio aprendi que para fazer “negócio” devemos ser, numa primeira fase, destemidos, criativos e estar atentos às necessidades do cliente, da empresa e do mercado. Depois é importante ser persistente e resiliente, uma vez que, um negócio pode demorar 3 meses a vários anos a fechar. Ter um espírito crítico sobre os últimos *updates* do mercado farmacêutico, estar atualizado relativamente às alterações regulamentares que surgem e às notícias em geral que podem influenciar a empresa também é fundamental. Por outro lado, esta experiência trouxe-me mais capacidades de autonomia e responsabilidade uma vez que, realizei tarefas importantes para o departamento.

Finalmente resta-me agradecer a toda a família Bluepharma pela excelente integração na equipa, agradecer de uma forma especial à minha orientadora Dr^a. Ana Jerónimo e à Dr^a. Margarida Neves, por todos os ensinamentos e conselhos, e claro a toda a equipa do BD, pela disponibilidade para me contextualizarem e ensinarem.

PARTE 2: Relatórios de Estágios Curriculares

2.B. Relatório de Estágio Curricular em Farmácia Comunitária

Orientadora Dr^a. Cláudia Ferreira

I. Introdução

O farmacêutico é um “especialista do medicamento e agente de saúde pública” e exerce a sua profissão baseada em conhecimentos científicos². A farmácia comunitária é a face mais visível da atividade farmacêutica onde há um contacto muito próximo com o público, tendo assim, o farmacêutico tem um papel fulcral na promoção do uso racional do medicamento, na adesão à terapêutica, e na salvaguarda da Saúde Pública².

Depois de um percurso académico de excelência nós, jovens farmacêuticos, saímos para o mercado de trabalho com conhecimentos atualizados e aptos a desempenhar as mais diversas tarefas inerentes ao ato farmacêutico. O estágio curricular é uma etapa imprescindível na formação dos futuros farmacêuticos, na medida em que permite, não só por em prática os conhecimentos adquiridos ao longo do curso, mas também oferece oportunidades de formação e crescimento profissional e pessoal. O meu estágio curricular em farmácia comunitária foi realizado na Farmácia Lusitana (FL), em Vila do Conde, no período de 1 de abril de 2019 a 2 de agosto de 2019, num total de 683 horas, sob a orientação Dr.^a Cláudia Ferreira e com o apoio de toda a equipa. Apesar de já ter realizado um estágio de verão em farmácia comunitária, este estágio curricular permitiu contactar diretamente com o atendimento ao público e, assim, vivenciar realmente o dia-a-dia de um farmacêutico comunitário e desempenhar todas as atividades intrínsecas a esta profissão. O presente relatório apresenta-se sob a forma de uma análise SWOT sigla de *Strengths*, *Weaknesses*, *Opportunities* e *Threats* (Forças, Fraquezas, Oportunidades e Ameaças). Através desta análise farei um balanço do estágio destacando os pontos fortes e fracos (perspetiva interna) do estágio e ainda, as oportunidades e as ameaças (perspetiva externa) que consegui extrair desta experiência.

2. Análise SWOT

Tal como anteriormente referido, o relatório de Estágio Curricular em Farmácia Comunitária será apresentado sob a forma de uma análise SWOT. Na tabela abaixo estão sumarizadas as forças, fraquezas oportunidades e ameaças que identifiquei ao longo do estágio.

Tabela 6: Análise SWOT do Estágio Curricular em Farmácia Comunitária.

<p style="text-align: center;"><u>FORÇAS</u></p> <p>Horário e Localização da farmácia. Grande dimensão e variedade de produtos. Formações. Preparação de medicamentos manipulados. Equipa e ambiente. Serviços prestados. Rastreios cardiovasculares gratuitos ao público e ateliers em escolas primárias. SIFARMA 2000® e Novo módulo de atendimentos do SIFARMA®. Implementação dos códigos DataMatriX</p>	<p style="text-align: center;"><u>OPORTUNIDADES</u></p> <p>Aplicação dos conhecimentos adquiridos no MICF. Compreensão das tarefas do farmacêutico comunitário. Desenvolvimento do sentido crítico e autonomia. Desenvolvimento de competências de comunicação. Desenvolvimento de conhecimentos na área da dermatocósmética, puericultura e suplementação. Associação da DCI aos nomes de marca. Contacto com várias estratégias de marketing e merchandising.</p>
<p>SWOT</p>	
<p style="text-align: center;"><u>FRAQUEZAS</u></p> <p>Inexistência de alguns serviços farmacêuticos.</p>	<p style="text-align: center;"><u>AMEAÇAS</u></p> <p>Desacreditação do farmacêutico. A YX]Mh YbrcgYg'chUXcg'</p>

FORÇAS

- **Horário e Localização da farmácia**

A FL tem um horário alargado, funcionando das 8:30 h às 22 h todos os dias, incluindo feriados²⁰. Nos meses de julho e agosto funciona até às 23 h²⁰. A FL localiza-se no centro da cidade e apanha os Caminhos de Santiago de Compostela, pelo que nos seus mais de 400 atendimentos diários, atende pessoas de vários estratos sociais, bem como de diversas nacionalidades e idades²⁰. Assim, tive oportunidade de aprender a adaptar-me às diversas personalidades dos clientes e situações no atendimento ao público o que contribuiu, sem dúvida, para a minha formação. Por outro lado, a afluência de clientes é variável ao longo do dia, no entanto, nos picos de maior afluxo apercebi-me da necessidade de saber gerir o tempo de atendimento, que não pode ser excessivamente demorado e não pode comprometer a qualidade do aconselhamento prestado.

- **Grande dimensão e variedade de produtos**

O facto de a FL ser uma farmácia de grandes dimensões, permitiu o contacto com uma grande diversidade de produtos. Para além do grande número de MSRM (Medicamentos Sujeitos a Receita Médica) permanentemente em *stock*, a FL possui uma grande variedade de MNSRM (Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica), produtos de dermocosmética, suplementação, higiene oral, puericultura, produtos naturais, perfumaria, aromaterapia e cuidados capilares, o que possibilita um aconselhamento mais personalizado e adequado às necessidades de cada utente²⁰. Efetivamente, a FL tem uma forte ação na área da dermocosmética o que contribuiu fortemente para o desenvolvimento dos meus conhecimentos sobre inúmeros produtos e marcas nesta área.

- **Formações**

Ao longo do estágio tive oportunidade de participar em várias formações proporcionadas pelas marcas, nomeadamente, Vichy[®], Uriage[®], Corega[®], Bioderma[®], Goldnutrition[®], Contour XR[®], Boiron[®]. Estas formações têm como objetivo dar a conhecer novos produtos ou simplesmente explicar as diferentes gamas da marca. Efetivamente, estas formações foram cruciais para conhecer de forma mais pormenorizada os produtos de cada marca, uma vez que me transmitiram informações adicionais aqueles que a equipa da farmácia já me tinha transmitido, nomeadamente, informação teórica relativamente à composição, propriedades, conselhos de utilização e orientações para o aconselhamento ao utente. Por outro lado, nestas formações foi possível experimentar alguns produtos e assim ter uma melhor perceção das suas características como a textura e o cheiro, garantindo assim um melhor e mais personalizado aconselhamento ao utente. Adicionalmente, a visita frequente de delegados de informação médica à farmácia, para apresentar novos produtos ou para promover outros já existentes, contribuiu para a minha familiarização com os produtos/medicamentos.

- **Preparação de medicamentos manipulados**

O medicamento manipulado é “qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico” e apesar de os medicamentos industrializados serem muito mais vendidos que os medicamentos manipulados, a preparação e prescrição de medicamentos manipulados é uma prática que se tem tornado cada vez mais procurada, principalmente no âmbito da medicina personalizada¹⁷. O laboratório da FL recebe diariamente várias prescrições e encomendas de medicamentos manipulados,

pelo que, existe na FL um farmacêutico exclusivo responsável pela sua produção e validação. Durante o estágio, participei na preparação de várias fórmulas magistrais e oficinais, designadamente: pomada de enxofre a 6 %, solução de Minoxidil 5 %, cápsulas anti-envelhecimento, cápsulas de bicarbonato sódio 500 mg, cápsulas de carbonato de cálcio 500 mg, cápsulas anti-queda para o cabelo, pó anti-transpirante e ainda, um rímel e delineador promotor do crescimento do pêlo. Para todos eles procedi ao preenchimento da ficha de preparação do manipulado (Anexo 1) e do rótulo, onde constam dados como, o nome do doente, o produto, a quantidade, a data de preparação e o prazo de validade (Anexo 2) e, ainda, ao cálculo do preço de venda ao público, de acordo com a legislação que consta da Portaria 769/2004, de 1 de Julho¹⁶. Para os manipulados sujeitos a receita médica era necessário associar à ficha de preparação e rotulo a respetiva receita médica e confirmar a sua conformidade. Efetivamente, a execução destas atividades permitiram-me lembrar e pôr em prática os conhecimentos adquiridos ao longo do MICF principalmente em Farmácia Galénica.

- **Equipa e ambiente**

A equipa da FL faz parte de um grupo de 2 farmácias. É constituída por 28 colaboradores, entre eles farmacêuticos, técnicos de farmácia, técnicos auxiliares de farmácia, administrativos, gestores comerciais, financeiros, e uma empregada de manutenção. A simpatia e boa disposição foram uma constante ao longo deste estágio, o que facilitou a minha integração na equipa e permitiu a partilha de conhecimentos de forma espontânea. Por outro lado, o profissionalismo e a ética farmacêutica foram valores transmitidos tendo sempre em vista a satisfação dos clientes. A adição, a disponibilidade oferecida por todos os colaboradores para me ensinar e tirar qualquer dúvida, foi crucial para o sucesso do meu estágio.

- **Serviços prestados**

Para além do aconselhamento farmacêutico e da dispensa de medicamentos, a FL proporciona aos seus utentes outros serviços farmacêuticos, nomeadamente, a medição de parâmetros bioquímicos, como a glicémia, o colesterol total, os triglicéridos, a pressão arterial, o peso corporal, a altura, o índice de massa corporal e a percentagem de gordura corporal²⁰. Os valores obtidos nestas medições são registados num cartão oferecido aos utentes para promover o registo contínuo desses valores permitindo assim, acompanhar a evolução dos parâmetros tanto pelo farmacêutico como pelo médico. Durante o estágio tive oportunidade de prestar estes serviços, que pelo facto de serem prestados num gabinete privado fomentam uma relação de maior proximidade e confiança entre o utente e o

farmacêutico, permitindo ao farmacêutico melhorar a adesão à terapêutica, alertar para a importância de estilos de vida saudáveis e medidas não farmacológicas. A FL disponibiliza também a administração de alguns injetáveis e ainda consultas de nutrição, de podologia e do pé diabético por uma profissional externa à farmácia. Recentemente introduziu o serviço de cessação tabágica.

- **Rastreios cardiovasculares gratuitos ao público e ateliers em escolas primárias**

Durante o mês de Maio, mês do coração, todas as sextas feiras de manhã a FL proporcionou aos seus clientes rastreios cardiovasculares gratuitos, na qual eu participei ativamente (ver Anexo 3). Também no dia 7 de junho de 2019, uma equipa constituída por quatro farmacêuticos da FL, na qual eu fazia parte, ofereceu à escola básica nº1 de Vila de Conde um *atelier* educativo sobre proteção solar, onde as crianças ficaram a conhecer os efeitos benéficos e maléficos do sol e algumas medidas preventivas para reduzir os riscos associados à exposição solar (ver Anexo 4). Estas atividades permitiram-me colocar em prática conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do MICEF, num contexto diferente do balcão de atendimento.

- **SIFARMA 2000® e Novo módulo de atendimento do SIFARMA®**

A maioria das farmácias portuguesas, incluindo a FL, utiliza o programa informático Sifarma 2000®, no entanto, quando iniciei o estágio na FL o novo módulo de atendimento do Sifarma® tinha sido recentemente instalado na farmácia, pelo que, durante o estágio tive a oportunidade de utilizar tanto o Sifarma 2000® como o novo módulo de atendimento do Sifarma®, aprendendo assim a dominar as valências de ambos. Uma vez que, num futuro próximo o objetivo é utilizar o novo módulo de atendimento do Sifarma®, tornou-se muito importante poder contactar com ele desde a sua implementação na farmácia.

- **Implementação dos Códigos DataMatrix**

A deteção de medicamentos falsificados e a identificação individual de embalagens, através da colocação de dispositivos de segurança nomeadamente, o dispositivo de prevenção de adulterações e identificador único, nas embalagens de certos medicamentos foi introduzida pela Diretiva 2011/62/EU, “Diretiva dos Medicamentos Falsificados” e está implementada em Portugal desde 9 de fevereiro de 2019¹⁸. O código do produto que permite reconhecer inequivocamente um medicamento é designado *Global Trade Item Number* (GTIN) e é apresentado na forma de um símbolo GSI DataMatrix que estrutura os dados e cria o Identificador Único⁷. Assim, as farmácias, aquando da dispensa de medicamentos, devem

proceder à ligação dos seus sistemas informáticos com o sistema de repositórios Europeu e proceder à verificação dos dispositivos de segurança e à desativação do identificador único dos medicamentos que forneçam aos seus utentes.⁷ Um dos pontos fortes deste estágio, foi ter assistido à implementação destes códigos nos medicamentos.

FRAQUEZAS

- **Inexistência de alguns serviços farmacêuticos diferenciados**

Apesar de a FL já prestar alguns serviços farmacêuticos, não possui outros como a preparação individualizada de medicação, a revisão da terapêutica ou acompanhamento farmacoterapêutico. Nestes serviços o farmacêutico tem um papel fundamental, na medida em que poderiam eventualmente, evitar problemas relacionados com a terapêutica, esclarecer dúvidas, promover a adesão à terapêutica e divulgar medidas não farmacológicas. Assim, seria interessante a FL desenvolver estes serviços não só na farmácia mas, também em parceria com os 5 lares de idosos com as quais já colabora na cedência de medicação. Por outro lado, tendo em conta que estes são serviços para os quais é dada formação durante o MICF, seria vantajoso para o estagiário colocar esses conhecimentos em prática.

OPORTUNIDADES

- **Aplicação dos conhecimentos adquiridos no MICF**

O estágio permite o contacto com casos reais, onde o aconselhamento de medidas não farmacológicas e a dispensa de MNSRM são essenciais. Estas situações permitiram colocar em prática os conhecimentos adquiridos ao longo do MICF, nomeadamente através das unidades curriculares de Farmacologia, Farmacoterapia, Indicação farmacêutica, Fitoterapia, Produtos de uso Veterinário e Dispositivos médicos, bem como, a reconhecer quais os produtos que melhor se adaptam às necessidades dos utentes. Abaixo seguem-me 2 casos práticos que refletem atendimentos que realizei:

- ✓ **CASO PRÁTICO I**

Uma senhora grávida dirige-se ao balcão da FL com uma prescrição médica de um manipulado de pomada de enxofre 6 %, após vir de uma consulta com um diagnóstico de sarna (escabiose). O médico aconselhou que toda a família aplicasse o manipulado. A sarna é uma infestação provocada por ácaros humanos (*Sarcoptes scabiei var. Hominis*) e tem como principais sinais e sintomas, comichão, papulas e/ou nódulos persistentes¹³. Geralmente é transmitida por contacto direto prolongado¹³. O Enxofre a 6 % é o único tratamento

farmacológico que pode ser usada em qualquer idade e em grávidas¹⁵. Depois de explicar o modo de utilização do manipulado de enxofre, (“aplicar em camada fina em todo o corpo seco, apos o banho, durante 3 dias consecutivos e repetir passado uma semana”), aconselhei a aplicação de um creme emoliente , após o tratamento com a pomada de enxofre, com o objetivo de hidratar a pele a aliviar o prurido e a irritação característicos^{14,15}. Também alertei para a necessidade de desinfecção de fômites, vestuários, e roupa da cama de forma a evitar recidivas. Finalmente aconselhei um anti-histaminico, para aliviar o prurido que pode permanecer até 2 a 4 semanas após eliminação completa do parasita¹⁴.

✓ CASO PRÁTICO 2

Uma senhora com 52 anos chega à FL e explica que tinha sido picada por abelhas em vários locais do corpo e que, apesar de já ter feito gelo, queria algo para lhe aliviar a dor e prurido. As picadas de insetos são reações cutâneas inflamatórias autolimitadas que surgem devido ao contacto com a saliva do inseto e caracterizam-se pelo aparecimento de pequenas úlceras, com inchaço, vermelhidão, prurido e dor¹⁹. Após algumas perguntas, percebi que a picada ocorrera há duas - três horas e que o utente não tinha tomado nenhum medicamento para aliviar os sintomas. Assim, aconselhei a toma de um analgésico e anti-inflamatório como o ibuprofeno 400 mg de 8 em 8 horas para aliviar a dor, um anti-histaminico oral como a ceterizina 10 mg uma vez por dia para aliviar o prurido e, ainda, um creme tópico com difenidramina (anti-histamínico), calamina (adstringente e protetor) e cânfora (sensação de frescura) 3 a 4 vezes por dia¹⁹. Após prevenir o utente para alguns efeitos secundários destes medicamentos, nomeadamente dos anti-histamicos orais que podem causar sonolência, fadiga e cefaleias, também alertei para a necessidade de retirar o ferrão da abelha, de continuar a colocar gelo nas zonas da picada, e de evitar coçar as zonas afetadas¹⁹. Se após 2 ou 3 dias não houver alívio dos sintomas ir ao médico¹⁹.

• **Compreensão das tarefas do farmacêutico comunitário**

Um dos pontos fortes deste estágio foi ter tido a oportunidade de contactar com as diversas tarefas que o farmacêutico comunitário desempenha para além do atendimento ao público e, assim, entender de forma mais prática o funcionamento geral de uma farmácia. A experiência prática é sempre um complemento valioso à formação teórica recebida e, tendo em conta que o MICF nos dá fortes bases teóricas para a vertente de farmácia comunitária, este estágio foi uma excelente oportunidade para pôr em prática os conhecimentos adquiridos. Ao longo do estágio apercebi-me da importância não só de um atendimento ao público de qualidade, mas também da organização e gestão da farmácia, bem como das tarefas

de *backoffice*, como a receção de encomendas e respetiva arrumação, a execução de devoluções, o controlo de temperaturas, a conferência do receituário, o controlo de prazos de validade e o acerto de *stocks*. Estas tarefas permitiram-me ter um contacto com a maioria dos produtos da farmácia, o que agilizou posteriormente o meu desempenho no atendimento ao balcão. A FL tem uma forte ação na venda de dermocosmética tendo centenas de produtos deste tipo²⁰. Desta forma, torna-se importante fazer uma boa gestão dos produtos sem rotação, na qual tive oportunidade de participar.

- **Desenvolvimento do sentido crítico e autonomia**

Um das oportunidades deste estágio foi sem dúvida o desenvolvimento do sentido crítico e a autonomia, tendo em conta a natureza prática das atividades em farmácia comunitária. Ao longo do estágio apercebi-me que o atendimento ao público é uma atividade que implica um forte sentido crítico, na medida em que, é necessário tomar decisões no aconselhamento e dispensa de medicamentos tendo em conta conhecimentos científicos, o uso racional de medicamentos e as características específicas de cada situação. Adicionalmente, durante estes meses foram-me dadas várias tarefas para além do atendimento ao público, como a preparação de manipulados, a receção de encomendas e respetiva arrumação, o acerto de *stocks*, a organização do armazém no âmbito projeto *Kaizen*, entre outras tarefas que implicam autonomia e responsabilidade, sempre com o apoio da equipa quando necessário⁵.

- **Desenvolvimento de competências de comunicação**

A interação com um público tão diversificado como o da FL permitiu melhorar bastante as minhas competências de comunicação e relacionamento interpessoal. Efetivamente, durante o aconselhamento e ato dispensa de medicamentos, é essencial criar uma boa comunicação com o utente, demonstrar disponibilidade para o ouvir, criar empatia e sobretudo, saber adaptar o discurso a cada utente e a cada situação. Assim, durante os atendimentos ao público procurei ser clara, assertiva e disponível para tirar qualquer dúvida, principalmente com os idosos, no sentido de garantir o cumprimento da indicação e posologia e, ainda, o uso racional de medicamentos.

- **Desenvolvimento de conhecimentos na área da dermocosmética, puericultura e suplementação**

Cada vez mais as pessoas cuidam da sua saúde e imagem, e para isso procuram produtos de qualidade que satisfaçam as suas necessidades. O farmacêutico é o profissional de

excelência para pode ajudar a população a fazer as melhores escolhas. Efetivamente a FL tem uma forte ação nas áreas da Dermofarmácia e cosmética, suplementação e puericultura, pelo que durante o estágio tive a oportunidade de contactar e aconselhar muitos produtos deste tipo²⁰.

- **Associação da DCI aos nomes de marca**

Efetivamente, ao longo do MICF, contactamos várias vezes com a denominação comum internacional (DCI) dos medicamentos, no entanto, é difícil que nos sejam transmitidos os seus nomes comerciais, pois, por vezes, uma substância ativa (SA) é representada por mais do que uma marca, e pelo facto de essa não ser a informação mais importante a reter. Ao contactar com os medicamentos, o estágio permitiu-me associar as substâncias ativas aos nomes comerciais, principalmente na receção das encomendas e na respetiva arrumação. Esta familiarização com os nomes de marca teve como principal vantagem, a agilização dos atendimentos ao público, pois muitas vezes os utentes pedem os medicamentos de marca.

- **Contacto com varias estratégias de *marketing* e *merchandising***

Ao longo do estágio na FL, apercebi-me das diferentes estratégias de *marketing* e *merchandising* utilizadas pela farmácia e pelas marcas para se diferenciarem no mercado. Na receção de encomendas e a posterior disposição dos produtos, aprendi que é necessário ter em conta os locais com mais visibilidade na farmácia, a rotação dos produtos e a organização dos lineares. Por outro lado, hoje em dia as redes sociais têm um lugar central na vida da maioria das pessoas, e como tal são utilizadas por muitas farmácias, como é o caso da FL, como estratégia de promoção dos seus produtos e serviços. Também nas formações promovidas pelas diferentes marcas apercebi-me da importância da existência de estratégias de *marketing* como os cartazes, os panfletos e as promoções. Assim, este estágio foi uma excelente oportunidade de conhecer técnicas de *marketing* e *merchandising* e perceber a forma como estas se refletiam posteriormente nas vendas.

AMEAÇAS

- **Desacreditação do farmacêutico**

Atualmente a população é bombardeada por informação nomeadamente, sobre doenças e produtos de saúde/medicamentos, seja pela internet, pela televisão ou pelos amigos e familiares. Por vezes, essa informação é pouco fidedigna e até mesmo errada. Durante o

estágio deparei-me várias vezes com esta realidade, onde os utentes pediam um produto específico porque tinham “lido na *internet*” ou “a vizinha usava”, mas que não se adequava à situação em causa. Em algumas situações mesmo após a explicação farmacêutica de qual seria o produto/medicamento mais indicado, o utente continuou insistente, pondo em causa os conhecimentos do farmacêutico.

- **Medicamentos Esgotados**

Durante o estágio apercebi-me da dramática realidade de medicamentos esgotados, onde os armazenistas não tinham alguns medicamentos e portanto, não os conseguiam fornecer às farmácias. Esta realidade, para além de por em causa o bom funcionamento da farmácia e do atendimento pode levar os utentes a interromper a toma de medicação obrigatória, pondo a sua saúde em risco.

3. Considerações Finais

A farmácia comunitária é a vertente das Ciências Farmacêuticas mais trabalhada ao longo do MICF, portanto, o estágio em Farmácia Comunitária representa o culminar de 5 anos de excelente formação onde os alunos são preparados para o exercício da profissão de farmacêutico comunitário.

O meu estágio em Farmácia Comunitária na FL foi sem dúvida um enorme desafio, uma vez que, nunca tinha contactado com o atendimento ao público. Ao longo destes 4 meses, para além de por em prática os meus conhecimentos para tomar decisões, tive de aprender a adaptar o meu discurso consoante o tipo de utente e situação, melhorando assim, as minhas capacidades de comunicação. Assim, considero que esta experiência contribuiu não só para a minha formação profissional, mas também pessoal.

Para finalizar, quero agradecer a toda a equipa da Farmácia Lusitana pelos ensinamentos transmitidos e, em especial à minha orientadora de estágio, Dr^a. Cláudia Ferreira, pela disponibilidade oferecida para me ensinar e esclarecer todas as dúvidas ao longo destes 4 meses e, ainda, pelos sábios conselhos.

Bibliografia

1. PITA, J. - A farmácia e o medicamento em Portugal nos últimos 25 anos. Debater a Europa. 2 (2010) 38-55.
2. PITA, J. - Propriedade de farmácia de oficina em Portugal. A propósito de mitos, erros e preconceitos. Farmácia Portuguesa 30 (2008) 32-35.
3. Bluepharma - Grupo Bluepharma. [Acedido a 11 março de 2019] Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/about-bluepharmagroup.php>
4. Bluepharma - Fabrico. [Acedido a 1 março de 2019] Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/manufacturing/production.php>
5. WILDI, R. - Small steps, big changes. Sanitas magazine. 1 (2017) 12-14.
6. Bluepharma - desenvolvimento de negócio. [Acedido a 3 março de 2019] Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/bdbusiness.php>
7. IPD analytics - Advanced decision-making support. [Acedido a 7 março de 2019] Disponível em: <http://www.ipdanalytics.com/>
8. Clarivate analytics - Cortellis. [Acedido a 7 março de 2019] Disponível em: <https://clarivate.com/products/cortellis/>
9. IQVIA - Ark patente inteligência. [Acedido a 7 março de 2019] Disponível em: <https://www.iqvia.com/our-customers/generics-manufacturers/ark-patent-intelligence>
10. Universidade de Coimbra - Cursos, Mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas. [Acedido a 7 março de 2019]. Disponível em: <https://apps.uc.pt/courses/PT/course/1172>
11. Bluepharma - Tecnologias. [Acedido a 3 março de 2019] Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/bdtechnologies.php>
12. Bluepharma - História. [Acedido a 4 março de 2019] Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/about-history.php>
13. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) - parasites: scabies. [Acedido a 8 de junho de 2019] Disponível em: www.cdc.gov/parasites/scabies/
14. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) - parasites: scabies, treatment, [Acedido a 8 de junho de 2019] Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/scabies/treatment.html>

15. Tavares M., Selores M. - Escabiose: recomendações práticas para diagnóstico e tratamento. *Nascer Crescer*, 22 (2013) 80-86.
16. INFARMED. Portaria n.º 769 / 2004, de 1 de julho. *Legislação Farmacêutica Compilada (2004)* 4-7.
17. INFARMED. Decreto-Lei n.º 95/2004, de 22 de abril. *Legislação Farmacêutica Compilada (2004)* 1-4.
18. INFARMED. Circular Informativa n.º 108/CD - Implementação dispositivos segurança (2019) 1-7.
19. KRINSKY, D.; FERRERI, S.; HEMSTREET, B.; HUME, A.; NEWTON, G.; ROLLINS, C.; TIETZE, K. - Handbook of non-prescription drugs: An Interactive Approach to Self Care. American Pharmaceutical Association 19 (2015) 989-997.
20. Farmácia Lusitana - Farmácia, [Acedido a 7 de julho de 2019], disponível em: <https://www.farmacialusitana.com/index.php/a-farmacia/>
21. Ordem dos farmacêuticos. Áreas Profissionais - Farmácia Comunitária. [Acedido a 14 de julho de 2019]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/>

Anexos

- Anexo I

FARMÁCIA LUSITANA



Ficha de Preparação do Manipulado

Solução de Minoxidil a 5%

Cliente:

Forma Farmacêutica: SOLUÇÃO

Data de Preparação: 29/07/2019

Prazo Validade : 25/01/2020

Nº Lote : FL-4784

Registo Copiador : 4.785

Condições de Conservação : Conservar no recipiente bem fechado, em local fresco e seco.

Posologia: Aplicar até 2 vezes por dia.

Qtd. Total Medicamento : 1 X 100,00 ml

Director Técnico : Dra. Sónia Vale

Operador : Dr. Jorge Rodrigues

Médico:

Honorários:	5,03 €	Valor Net :	24,69 €	Valor PVP
Factor Multiplicativo:	3,00	Valor IVA :	1,48 €	
		Valor Total:	26,17 €	

Matérias Primas	Usar	Nº Lote	Origem	Qtd. Usada	Unid	Preço Aq. a/ IVA	Factor Multiplic.	Preço Mat.prima
Minoxidil	5 g	13799/50/	Farma-Química	5,00	g	0,15 €	2,20	1,60 €
Propilenoglicol	25,9 g	180978-P-	Acofarma	25,00	ml	0,01 €	1,90	0,33 €
Água Purificada	15 g	0086095	Guinama	15,00	ml	0,00 €	1,90	0,06 €
Alcool a 96º	44,55 g	19/0510	Manuel Vieira e	55,00	ml	0,00 €	1,90	0,10 €
Glicerina	6,5 g	0083184	Guinama	5,00	ml	0,01 €	2,20	0,07 €
Subtotal								2,16 €

Preparação	
Verificar o estado de limpeza de todo o material e das bancadas a utilizar.	
Pesar e misturar em copo de diluição de tamanho adequado, previamente tarado, a água, a glicerina, o propilenoglicol e 2/3 do volume de etanol a 96% (V/V).	
Aquecer a mistura em banho de água (50 - 60 °C) e dissolver o minoxidil, sob agitação magnética.	
Após arrefecimento total, transferir para balão volumétrico de tamanho adequado, previamente tarado, completar com o restante etanol a 96% (V/V) e filtrar a solução.	
Acondicionar o produto semi-acabado em embalagem adequada e rotular.	
Lavar todo o material e as bancadas utilizados com álcool a 70% e secar.	

Embalagem	Tipo	Nº Lote	Fornecedor	Capac	Qtd	Preço	Fact. Mult.	Valor Net
Frasco vaporizador cilíndrico	EMBAL	2019-447	Fagron	125 ml	1,00	1,45 €	1,20	1,74 €
Subtotal								1,74 €

Ensaio	Especificação	Conforme	Utilizador	Assinatura
Cor	Incolor	<input checked="" type="checkbox"/>	Dr. Jorge Rodrigu	
Odor	Alcool	<input checked="" type="checkbox"/>	Dr. Jorge Rodrigu	
Aspecto	Limpida e transparente	<input checked="" type="checkbox"/>	Dr. Jorge Rodrigu	
pH	8,0 - 9,5	<input checked="" type="checkbox"/>	Dr. Jorge Rodrigu	
Quantidade	100 mililitros	<input checked="" type="checkbox"/>	Dr. Jorge Rodrigu	

(Data)

(Assinatura)

- **Anexo 2**

FARMÁCIA LUSITANA



Praça Luís de Camões, 20
4480-719
Telef: 252633133
Director Técnico: Dra. Sónia Vale

Solução de Minoxidil a 5%

Quant Dispensada: **PVP: 15,00 €**
1 X 100,00 ml

Teor: Minoxidil 50 mg/mL

Aplicação: USO EXTERNO

Posologia : Aplicar até 2 vezes por dia.

Advertencia : Não ingerir. Manter fora do alcance das crianças.

Conservação: Conservar no recipiente bem fechado, em local fresco e seco.

Preparado em: 29/07/2019

Usar até: 25/01/2020

Lote Nr: FL-4784

- **Anexo 3**



- **Anexo 4**

