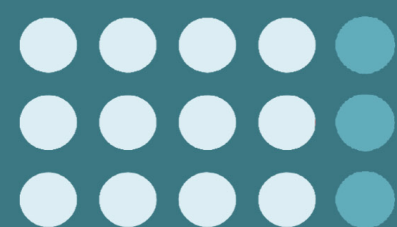
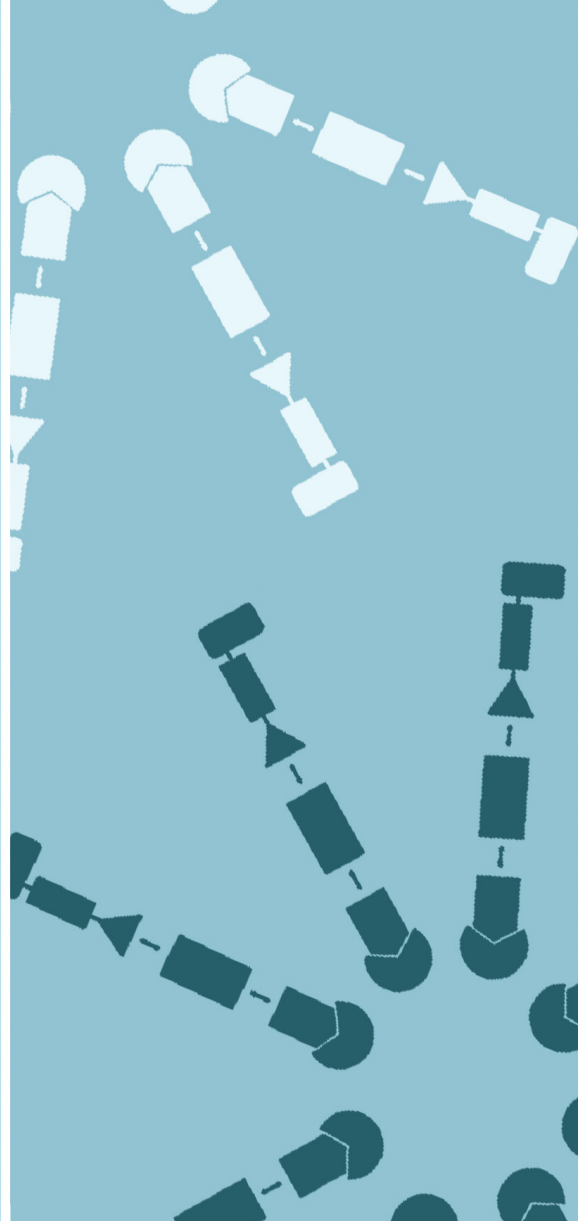




IPOCFG, EPE



Farmácia
São José

João Filipe Duarte Nogueira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Inflamassomas — da Investigação à Terapêutica” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, do Dr. Paulo Monteiro, da Dr.ª Clementina Varela e da Professora Doutora Maria Teresa Teixeira Cruz Rosete e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

João Filipe Duarte Nogueira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Inflamassomas — da Investigação à Terapêutica” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, do Dr. Paulo Monteiro, da Dr.^a Clementina Varela e da Professora Doutora Maria Teresa Teixeira Cruz Rosete e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2017



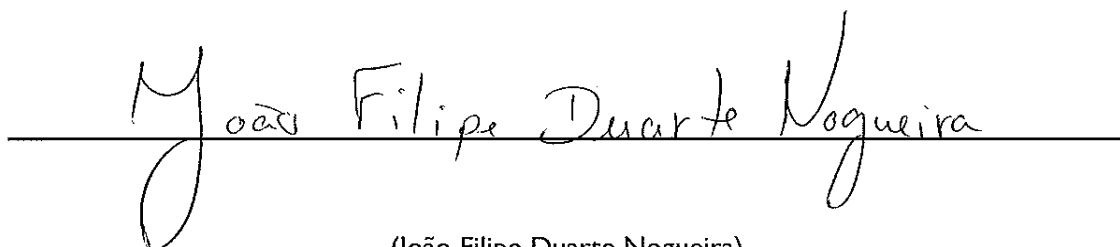
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Declaração de Integridade

Eu, João Filipe Duarte Nogueira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2012140198, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Inflamassomas – da Investigação à Terapêutica” 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, 8 de setembro de 2017.

A handwritten signature in black ink, reading "João Filipe Duarte Nogueira", is written over a solid horizontal line. The signature is cursive and spans across the line.

(João Filipe Duarte Nogueira)

"Once we accept our limits, we go beyond them."

Albert Einstein

Agradecimentos

Agradeço a toda a equipa dos Serviços Farmacêuticos do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E., principalmente à Dr.^a Clementina Varela, minha orientadora, por me ter acompanhado durante esta etapa e por toda a disponibilidade. Uma palavra especial a todos os Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica, pela forma como me acolheram e me acompanharam ao longo do estágio.

Agradeço a toda a equipa técnica da Farmácia São José, por todos os conhecimentos transmitidos, camaradagem e auxílio, principalmente ao Dr. Paulo Monteiro, meu orientador, por me ter proporcionado este estágio e por ser um verdadeiro exemplo de profissionalismo na área farmacêutica. Uma palavra especial também à Dr.^a Joana Silva, a minha mentora durante este estágio, por toda a aprendizagem, disponibilidade, compreensão e paciência.

Um agradecimento especial aos meus colegas estagiários, por toda a partilha e por todo o espírito de companheirismo.

À Professora Doutora Maria Teresa Teixeira Cruz Rosete, por toda a disponibilidade e orientação durante a elaboração da minha Monografia, um sincero obrigado.

À minha família, pais, irmão, avó e tia-avó, um agradecimento muito especial, por todo o apoio e compreensão e por me terem proporcionado esta longa jornada. Serão sempre o meu maior exemplo, muito obrigado!

A todos os meus amigos, por terem feito de Coimbra a minha segunda casa, por todos os momentos partilhados e aventuras. Um agradecimento muito especial à Phartuna – Tuna de Farmácia de Coimbra pelos momentos que vivemos e por todo o espírito.

A todos, muito obrigado!

Índice

Capítulo I

Relatório de Estágio em Farmácia Hospitalar

Abreviaturas	9
1. Introdução	10
2. Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E.	10
2.1. Serviços Farmacêuticos do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E.	11
3. Análise SWOT	12
3.1. Pontos Fortes	13
3.1.1. Contacto com a área da oncologia e com o doente oncológico	13
3.1.2. Plano de estágio e contacto com os vários setores dos Serviços Farmacêuticos.....	14
3.1.3. Desenvolvimento de trabalhos de pesquisa	15
3.1.4. Equipa multidisciplinar	16
3.2. Pontos Fracos	16
3.2.1. Carácter observacional do estágio	16
3.2.2. Falta de conhecimentos aprofundados em determinadas áreas	16
3.3. Oportunidades	17
3.3.1. Controlo dos <i>stocks</i> de medicamentos em todos os serviços do hospital.....	17
3.3.2. Reestruturação do Serviço de Medicina Nuclear	17
3.4. Ameaças	17
3.4.1. Distanciamento entre o farmacêutico e o doente	17
3.4.2. Processo de escolha e aquisição dos medicamentos	18
4. Conclusão	18
Referências Bibliográficas	19
Anexo I	20
Anexo 2	23

Capítulo II

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Abreviaturas	26
1. Introdução	27

2. Análise SWOT	27
2.1. Pontos Fortes	28
2.1.1. Localização e horário de funcionamento da farmácia	28
2.1.2. Equipa técnica	29
2.1.3. Dermocosmética	29
2.1.4. Fidelização dos utentes	30
2.1.5. Preparação de medicamentos manipulados	30
2.1.6. Gestão e dinamização da farmácia	31
2.1.7. Conferência de receituário e receção de encomendas	31
2.1.8. Aconselhamento farmacêutico	32
2.2. Pontos Fracos	33
2.2.1. Conteúdos programáticos do MICF	33
2.2.2. Associação entre nomes comerciais de medicamentos e os princípios ativos	34
2.3. Oportunidades	34
2.3.1. Receitas eletrónicas desmaterializadas	34
2.3.2. Formações	35
2.3.3. Serviços disponibilizados pela farmácia	35
2.4. Ameaças	36
2.4.1. Locais de venda de MNSRM	36
2.4.2. Adesão dos utentes aos medicamentos genéricos	36
3. Conclusão	37
Referências Bibliográficas	38
Anexo I	39

Capítulo III

Inflamassomas – da Investigação à Terapêutica

Abreviaturas	41
Resumo/Abstract	43
1. Introdução	44
2. Inflamassomas	45
2.1. Visão geral e funcionamento	45
2.2. Tipos de inflamassomas	46
2.2.1. Inflamassoma NLRPI	47

2.2.2. Inflamassoma NLRP3	48
2.2.3. Inflamassoma NLRC4	49
2.2.4. Inflamassomas AIM2 e PYRIN	50
2.3. Mecanismos moleculares de ativação do inflamassoma NLRP3	50
2.4. Modulação do funcionamento dos inflamassomas por fatores de virulência.....	53
2.5. Mecanismos de regulação da atividade do NLRP3	54
3. Relevância fisiopatológica dos inflamassomas	56
3.1. Doenças do Sistema Nervoso Central	56
3.2. Hipertensão arterial	57
3.3. Aterosclerose	58
3.4. Diabetes tipo 2	58
3.5. Cancro	59
3.6. Mesotelioma Maligno	59
3.7. Deficiência de Mevalonato Cinase	60
3.8. Lesões intestinais provocadas por AINEs	60
4. Adjuvantes de vacinas – ação nos inflamassomas	61
5. Estratégias terapêuticas	63
5.1. Antagonistas da IL-1 β	63
5.2. Antagonistas da IL-18	64
5.3. Inibidores do NLRP3	64
5.4. Inibidores da caspase-1	65
5.5. Antagonistas do recetor purinérgico P2X7	66
5.6. Indutores da autofagia	66
5.7. MicroRNA	67
5.8. Isoliquiritigenina	67
5.9. Extrato de <i>Paeonia lactiflora Pallas</i>	68
5.10. X-shaped DNA	68
5.11. Antioxidantes	69
6. Conclusão	70
Referências Bibliográficas	71
Anexo 1	75
Anexo 2	76
Anexo 3	77
Anexo 4	78

CAPÍTULO I

Relatório de Estágio em Farmácia Hospitalar

(Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E.)

Abreviaturas

CFT – Comissão de Farmácia e Terapêutica

DCI – Denominação Comum Internacional

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FHNM – Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos

IPOCFG, E.P.E. – Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E.

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

SNS – Serviço Nacional de Saúde

TDT – Técnico de Diagnóstico e Terapêutica

UPC – Unidade de Preparação de Citotóxicos

I. Introdução

No âmbito da unidade curricular, Estágio Curricular, do quinto ano do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), realizei um estágio curricular nos Serviços Farmacêuticos do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E. (IPOCFG, E.P.E.), no período de 9 de janeiro a 14 de março, sob a orientação da Dr.^a Clementina Varela e restante equipa.

O farmacêutico é o profissional de saúde mais especializado na área do medicamento e tem um papel preponderante em toda a dinâmica de funcionamento dos Serviços Farmacêuticos Hospitalares, que constituem uma estrutura de máxima importância ao nível dos cuidados de saúde prestados em meio hospitalar. Neste sentido, foi bastante proveitoso poder presenciar o papel do farmacêutico no seio de uma equipa multidisciplinar de saúde e o contexto diário daquilo que é a sua realidade profissional.

Neste relatório pretendo relatar a experiência que foi a realização deste estágio, uma etapa que considero fundamental para o meu processo de formação enquanto farmacêutico. Após uma breve e sucinta apresentação do IPOCFG, E.P.E. e dos seus Serviços Farmacêuticos, irei focar-me numa análise SWOT. Esta análise irá incidir sob os pontos fortes (*Strengths*), os pontos fracos (*Weaknesses*), as oportunidades (*Opportunities*) e as ameaças (*Threats*) do estágio que realizei, no que diz respeito à frequência do estágio, à integração da aprendizagem teórica no contexto prático profissional e à adequação dos conhecimentos adquiridos durante o MICF, relativamente às exigências profissionais atuais do farmacêutico. Além disto, pretendo descrever e demonstrar os conhecimentos obtidos ao longo deste período, bem como todas as situações que considero relevantes e que contribuíram para a sua valorização.

2. Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E.

De acordo com Regulamento Interno do IPOCFG, E.P.E., este hospital trata-se de uma pessoa coletiva de direito público de natureza empresarial dotada de autonomia administrativa, financeira e patrimonial [1].

Esta instituição é uma unidade hospitalar integrada na rede de unidades prestadoras de cuidados de saúde do Serviço Nacional de Saúde (SNS), especializada no diagnóstico e tratamento de doenças oncológicas em toda a Região Centro do país. Por outro lado, tem também como missão a participação na formação de profissionais de saúde e o

desenvolvimento de projetos e programas de investigação, formação, ensino e rastreio oncológico [1].

Desta forma, o IPOCFG, E.P.E. assume-se como dos centros oncológicos de referência a nível nacional, destacando-se nas áreas do tratamento, investigação, ensino, diagnóstico, reabilitação e continuidade de cuidados [1].

2.1. Serviços Farmacêuticos do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E.

Segundo o Regulamento Interno do IPOCFG, E.P.E., os Serviços Farmacêuticos são uma das áreas de suporte à prestação de cuidados de saúde, responsáveis por toda a gestão, circuito, manipulação e dispensa de medicamentos e produtos farmacêuticos. As suas competências passam por participar na seleção dos medicamentos e produtos farmacêuticos que estão disponíveis no hospital, pela sua distribuição aos doentes em regime de internamento e de ambulatório e produção de formulações adequadas a diversos fins específicos do hospital. Além disto, também é da responsabilidade dos Serviços Farmacêuticos a garantia da boa utilização dos medicamentos e produtos farmacêuticos, através da transmissão de informação, do exercício da farmácia clínica, da participação em comissões técnicas e multidisciplinares, da colaboração em ensaios clínicos, da orientação de estágios e da formação contínua dos profissionais de saúde [1].

Os Serviços Farmacêuticos Hospitalares desenvolvem um conjunto de atividades farmacêuticas, exercidas em organismos hospitalares ou serviços a estes ligados, que são designadas por “atividades de Farmácia Hospitalar”. Desta forma, assumem-se como departamentos com autonomia técnica e científica, sujeitos à orientação geral dos Órgãos de Administração dos Hospitais, perante os quais respondem pelos resultados do seu exercício. Na prática, são o serviço hospitalar que assegura a terapêutica medicamentosa dos doentes, sendo responsáveis pela qualidade, eficácia e segurança dos medicamentos. A sua direção é obrigatoriamente assegurada por um farmacêutico hospitalar [2].

No IPOCFG, E.P.E., os Serviços Farmacêuticos encontram-se instalados no 1º piso do edifício dos Cuidados Paliativos, funcionando das 9h às 17h30, de segunda a sexta-feira, e das 9h às 13h, aos sábados. A partir da hora de encerramento há sempre uma farmacêutica de prevenção.

Os Serviços Farmacêuticos encontram-se sob a direção da Dr.^a Clementina Varela, estando a subcoordenação a cargo da Dr.^a Ana Cristina Teles. O corpo farmacêutico é ainda constituído pela Dr.^a Ana Costa, Dr.^a Andrea Silva, Dr.^a Cristina Baeta, Dr.^a Graça Rigueiro, Dr.^a Maria Inês Costa, Dr.^a Rita Lopes e pela Dr.^a Marina Sales. A restante equipa é

constituída por Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica (TDTs), cuja coordenação está a cargo de Prazeres Sacramento, um assistente técnico, auxiliares de ação médica e assistentes operacionais. Cada um destes profissionais possui tarefas individuais específicas, que são realizadas com o maior rigor, de forma a garantirem que o circuito do medicamento é o mais seguro, tanto no meio hospitalar, como no ato da sua dispensa ou administração.

Fisicamente, os Serviços Farmacêuticos do IPOCFG, E.P.E. encontram-se compartimentados em seis áreas principais, nomeadamente a área de distribuição clássica ou tradicional e armazenamento de medicamentos, área de distribuição individualizada diária em dose unitária, área de distribuição de medicamentos em regime de ambulatório, radiofarmácia, Unidade de Preparação de Citotóxicos (UPC) e a área de reembalagem de medicamentos. Durante o estágio que realizei neste serviço tive a oportunidade de percorrer todos estes setores e de experienciar as várias atividades levadas a cabo em cada um deles.

3. Análise SWOT

Uma análise SWOT é uma ferramenta de gestão muito utilizada, que permite avaliar uma dada atividade, quer numa vertente interna, em relação aos pontos fortes (*Strengths*) e aos pontos fracos (*Weaknesses*), quer numa vertente mais externa, relativamente a oportunidades (*Opportunities*) e a ameaças (*Threats*). Vulgarmente, este tipo de análise é conhecido pelo acrónimo SWOT.

Posto isto, apresento a minha análise SWOT relativa a este estágio, onde abordo os aspetos que considero que valorizaram o meu estágio, as dificuldades sentidas durante a realização do mesmo, mas também as oportunidades e as ameaças que reconheci. Na Tabela I encontram-se enumerados aqueles que considero os pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças.

Tabela I – Análise SWOT do meu estágio curricular em Farmácia Hospitalar.

	PONTOS FORTES	PONTOS FRACOS
FATORES INTERNOS	<ul style="list-style-type: none"> Contacto com a área da oncologia e com o doente oncológico Plano de estágio e contacto com os vários setores dos Serviços Farmacêuticos Desenvolvimento de trabalhos de pesquisa Equipa multidisciplinar 	<ul style="list-style-type: none"> Carácter observacional do estágio Falta de conhecimentos aprofundados em determinadas áreas
	OPORTUNIDADES	AMEAÇAS
FATORES EXTERNOS	<ul style="list-style-type: none"> Controlo dos stocks de medicamentos em todos os serviços do hospital Reestruturação do Serviço de Medicina Nuclear 	<ul style="list-style-type: none"> Distanciamento entre o farmacêutico e o doente Processo de escolha e aquisição dos medicamentos

3.1. Pontos Fortes

3.1.1. Contacto com a área da oncologia e com o doente oncológico

Dado que o IPOCFG, E.P.E. é um hospital especializado, um dos pontos fortes deste estágio foi, sem dúvida, o contacto com a área da oncologia e com o doente oncológico, um tipo de doentes que, a meu ver, é bastante especial. A oncologia, até então, era uma área clínica sobre a qual não tinha grandes conhecimentos, quer em termos de terapêuticas, quer em relação aos cuidados de saúde que são prestados nesta área. Neste sentido, o estágio foi muito enriquecedor, porque realmente, além de ter trabalhado diariamente com medicamentos mais gerais e comuns, pude ter contacto com medicação antineoplásica que desconhecia. Desde medicamentos citotóxicos a fármacos que constituem protocolos de terapêutica hormonal contra o cancro, pude perceber a complexidade que é o tratamento e o acompanhamento de um doente oncológico, uma área em relação à qual inicialmente não tinha muitos conhecimentos.

Nesta área, o farmacêutico tem várias frentes de intervenção, que vão desde a validação da prescrição médica de doentes em regime de internamento ou validação de protocolos de quimioterapia até à dispensa de fármacos em regime de ambulatório.

Com este estágio pude perceber que a investigação científica mais atual tem um peso muito importante, permitindo novas estratégias terapêuticas para o tratamento dos doentes. Trata-se de uma área em que a atualização científica é extremamente importante, uma vez que todos os dias podem surgir novos dados relevantes.

Durante as visitas médicas que tive oportunidade de acompanhar, no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, nas idas ao Hospital de Dia da quimioterapia e durante o período em que estive no Ambulatório, pude contactar de perto com vários doentes oncológicos. Em oncologia, mais do que provavelmente noutras áreas clínicas, cada doente é um doente, cada terapêutica é uma terapêutica e cada história é uma história. Saliento o papel de acompanhamento que é feito ao nível do ambulatório, em relação à educação dos doentes relativamente à medicação dispensada, onde se prestam todas as explicações necessárias para um uso racional e com segurança dos medicamentos.

3.1.2. Plano de estágio e contacto com os vários setores dos Serviços

Farmacêuticos

A boa organização do meu plano de estágio foi um dos pontos fortes, na medida em que me permitiu contactar com todos os setores dos Serviços Farmacêuticos do IPOCFG, E.P.E.

Iniciei o estágio no setor da distribuição tradicional de medicamentos e armazém, onde pude contactar com os processos de receção de encomendas e o seu armazenamento nos locais indicados, de acordo com as suas especificações. Todos os medicamentos são armazenados segundo o princípio *first in, first out* e está aplicado o estabelecido pela Norma nº 020/2014, da Direção-Geral da Saúde, que define a lista de medicamentos LASA (*Look Alike, Sound Alike*) [3], de forma a evitarem-se erros durante a dispensa de medicamentos. Pude acompanhar, também, a receção e o armazenamento de materiais inflamáveis, gases medicinais e soros e injetáveis de grande volume, que têm locais de armazenamento distintos.

Durante este período, além de auxiliar na dispensa dos medicamentos solicitados pelos diversos serviços do hospital, tive a oportunidade de auxiliar na preparação de algumas fórmulas magistrais, nomeadamente suspensões de nistatina composta para bochechos, no setor da farmacotecnia.

Posteriormente, acompanhei o dia a dia do setor de distribuição individualizada diária em dose unitária para os doentes em regime de internamento, aproximadamente durante duas semanas. Neste setor contactei de perto com a validação da medicação de cada doente, uma função dos farmacêuticos, e auxiliei os TDTs na preparação da terapêutica medicamentosa individualizada em módulos de gavetas para cada doente, para um período de 24 horas.

De seguida, durante outras duas semanas, acompanhei o trabalho levado a cabo no setor do ambulatório, onde realmente contactei com vários medicamentos antineoplásicos e

tive uma percepção maior daquilo que são os protocolos terapêuticos para alguns tipos de cancro.

Nas últimas duas semanas do meu estágio, contactei com outro setor da farmacotecnia, a UPC, onde são preparados os medicamentos dos protocolos de quimioterapia dos serviços de Oncologia Médica e Hospital de Dia. Além de ter acompanhado a validação dos protocolos, realizada pelos farmacêuticos, tive a oportunidade de auxiliar o trabalho dos TDTs na preparação dos medicamentos citotóxicos nas câmaras de segurança biológica. Por último, no final do estágio ainda acompanhei as tarefas realizadas no setor da radiofarmácia.

Sem dúvida que este estágio me permitiu adquirir uma visão bastante completa daquilo que é o funcionamento de um Serviço Farmacêutico Hospitalar e de todo o trabalho que é realizado, tendo acompanhado bem de perto todo o circuito do medicamento, desde a sua aquisição à sua dispensa, bem como a intervenção do farmacêutico em todas essas etapas.

3.1.3. Desenvolvimento de trabalhos de pesquisa

Durante o estágio tive a oportunidade de realizar dois trabalhos de pesquisa. Durante o período de tempo em que estive no setor da dispensa de medicamentos individualizada diária em dose unitária, realizei um levantamento dos medicamentos que foram enviados para os diferentes serviços e que foram devolvidos aos Serviços Farmacêuticos. Por vezes há um grande volume de medicação que é devolvida/revertida, uma vez que o próprio serviço hospitalar tem um *stock* próprio de medicamentos. Neste sentido, fiz um levantamento dessas revertências, com o auxílio de uma farmacêutica, de forma a tirar algumas conclusões em relação à própria gestão dos medicamentos, tendo em conta os recursos disponíveis. Os resultados e as conclusões encontram-se apresentados no Anexo 1.

Aquando da minha passagem pelo setor do ambulatório, desenvolvi um ficheiro com todos os medicamentos dispensados em regime de ambulatório no IPOCFG, E.P.E. e com a indicação de como proceder em caso de omissão de uma das tomas. Trata-se de um documento meramente auxiliar e de fácil consulta, para o caso de surgir alguma questão, dado que é uma dúvida que surge frequentemente por parte dos doentes. No Anexo 2 encontra-se uma amostra dessa tabela, uma vez que a original é muito extensa.

No fundo, estes trabalhos de pesquisa que desenvolvi fizeram com que pudesse aprofundar mais os meus conhecimentos em relação aos fármacos disponíveis que são utilizados no IPOCFG, E.P.E. e com que entendesse melhor o circuito do medicamento em meio hospitalar e de que forma é que os vários serviços se articulam entre si.

3.1.4. Equipa multidisciplinar

O facto de durante o estágio ter contactado com uma equipa multidisciplinar constituída por farmacêuticos, TDTs e assistentes operacionais, que me acompanharam e orientaram durante o meu percurso no IPOCFG, E.P.E. foi, sem dúvida, um dos pontos fortes. Perceber de que forma é que as atividades realizadas por cada uma destas entidades se inserem naquele que é o principal objetivo dos Serviços Farmacêuticos, foi importante para entender a importância da cooperação entre os diferentes profissionais de saúde. Juntos, devem desempenhar uma correta manipulação, controlo e dispensa dos medicamentos, garantindo, assim, a segurança dos mesmos e o seu uso racional e responsável.

3.2. Pontos Fracos

3.2.1. Carácter observacional do estágio

Como em qualquer outra área profissional, os conhecimentos apreendidos são consolidados com a prática. No entanto, dado o nível de importância que tem a intervenção dos farmacêuticos hospitalares, por vezes o estágio foi mais observacional do que prático. No entanto, é completamente compreensível que certas tarefas não possam ser desempenhadas por um estagiário. Ainda assim, foi interessante poder executar algumas das funções dos TDTs, sendo que teria sido proveitoso, no meu ponto de vista, ter tido um contacto ainda mais prático com funções exercidas pelos farmacêuticos.

3.2.2. Falta de conhecimentos aprofundados em determinadas áreas

Principalmente no início do estágio e durante o período de tempo em que estive no setor do ambulatório, senti algumas falhas de conhecimento em relação a algumas terapêuticas disponíveis. Realmente, a área da oncologia é uma área muito vasta e com a qual não contactamos muito durante o decorrer do MICF. Também durante as visitas médicas que realizei senti alguma dificuldade em processar toda a informação, uma vez que se estava a falar de quadros clínicos bastante complicados. No entanto, todas estas dificuldades só me motivaram a procurar respostas e tentar colmatar essas falhas de conhecimento, para que pudesse mais facilmente acompanhar os problemas que iam surgindo no dia a dia.

Nesse aspeto, toda a equipa de profissionais do IPOCFG, E.P.E. se mostrou sempre extremamente colaborativa e disposta a esclarecer-me toda e qualquer dúvida.

Não obstante, seria importante, ao nível do plano curricular do MICF, haver uma reformulação, no sentido de permitir um maior aprofundamento da área oncológica durante

o ciclo de estudos, de forma a integrar mais conhecimentos de farmacologia, farmacocinética e farmácia clínica, relativamente a esta área. Além disto, seria oportuno, na minha opinião, haver uma maior atualização científica das matérias lecionadas.

3.3. Oportunidades

3.3.1. Controlo dos stocks de medicamentos em todos os serviços do hospital

Na maioria dos serviços do hospital, cada enfermeiro-chefe faz o pedido de medicamentos através do sistema informático GHAF2010®, por Denominação Comum Internacional (DCI), que é atendido nos Serviços Farmacêuticos por um TDT, sendo no final feita uma conferência cruzada por outro TDT.

Atualmente, apenas o serviço de Oncologia Médica e Hospital de Dia recebem a visita semanal dos TDTs para contagem de *stocks* existentes, para posterior reposição dos níveis de medicamentos em falta. Contudo, na minha opinião, seria uma oportunidade adaptar este procedimento a todos os serviços existentes no IPOCFG, E.P.E., possibilitando um controlo mais rigoroso do circuito do medicamento, fomentando o seu uso racional e a diminuição dos custos inerentes ao seu uso incorreto a nível hospitalar. Estas tarefas podem ser perfeitamente desempenhadas por membros dos Serviços Farmacêuticos, diminuindo o tempo que a equipa de enfermagem despende com estes procedimentos.

3.3.2. Reestruturação do Serviço de Medicina Nuclear

A perspetiva de obras no serviço de Medicina Nuclear irá envolver uma grande reestruturação do setor da radiofarmácia, quer em termos de espaço, quer em termos de possibilidade de se realizarem mais procedimentos. Estas mudanças, caso se efetuem, irão implicar também algumas mudanças nos Serviços Farmacêuticos, nomeadamente ao nível da contratação de mais profissionais e da realização de mais protocolos.

3.4. Ameaças

3.4.1. Distanciamento entre o farmacêutico e o doente

Penso que existe ainda algum distanciamento entre o farmacêutico hospitalar e o doente. O facto de o farmacêutico não participar nas visitas médicas de todos os serviços do IPOCFG, E.P.E., pode dificultar a sua prática profissional, dado que lhe podem escapar alguns aspetos que seriam importantes aquando da validação da prescrição médica. Neste sentido, seria importante apostar na presença de um farmacêutico em todas as visitas médicas e implementar um sistema de reconciliação da terapêutica que envolvesse os farmacêuticos.

3.4.2. Processo de escolha e aquisição dos medicamentos

A seleção de medicamentos para o IPOCFG, E.P.E. é feita pela Comissão de Farmácia e Terapêutica (CFT) e tem por base o Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos (FHNM), bem como as necessidades terapêuticas dos doentes do hospital não contempladas no FHNM. O processo de escolha de medicamentos processa-se por concurso público, no início de todos os anos, estando envolvida muita demora e burocracia.

Além de ser um processo muito moroso, que pode comprometer o acesso às terapêuticas, o único critério de seleção é o preço, dada a conjuntura económica atual. Assim, assiste-se a uma mudança anual dos medicamentos disponíveis no hospital, podendo isso comprometer algumas terapêuticas ou até mesmo a própria adesão à terapêutica.

4. Conclusão

O Estágio nos Serviços Farmacêuticos do IPOCFG, E.P.E. foi, efetivamente, uma experiência bastante enriquecedora, que me permitiu contactar com uma realidade profissional do farmacêutico completamente diferente do que já tinha experienciado. No final do estágio, fiquei com a certeza de que o papel do farmacêutico a nível hospitalar, apesar de nem sempre estar visível a todos, acaba por ser um dos pilares de suporte dos cuidados de saúde que são prestados em Portugal.

Apesar de ter tido apenas a duração de dois meses, aproximadamente, foi uma enorme aprendizagem. Essa aprendizagem não se centrou apenas em conhecimentos científicos de farmacologia e farmácia clínica, mas também numa aprendizagem humanística, através do contacto diário com os doentes.

Na minha opinião, e em jeito de conclusão, a área profissional da farmácia hospitalar em Portugal merece uma reestruturação, quer no aumento da sua expressão e contacto com os doentes, quer ao nível do acesso a esta área. No dia 20 de julho de 2017, o Conselho de Ministros aprovou dois decretos-leis que estabelecem o regime legal da carreira especial farmacêutica na Administração Pública e os requisitos de habilitação profissional para integração nessa carreira, pelo que poderá estar dado o passo de partida para essa reestruturação que é desejada.

Referências Bibliográficas

1. **Regulamento Interno do IPOCFG, E.P.E.** [Acedido a 7 de março de 2017]. Disponível na *Internet*: <https://ipocoimbrafg.files.wordpress.com/2016/05/regulamento-interno-ipo-coimbra-2013.pdf>.
2. BROU, M. H. L., FEIO, J. A. L., MESQUITA, E., RIBEIRO, R. M. P. F., BRITO, M. C.M., CRAVO, C., & PINHEIRO, E. (2005). - **Manual da Farmácia Hospitalar**. *Ministério Da Saúde*, 1969.
3. **Norma nº020/2014 da Direção Geral de Saúde.** [Acedido a 25 de junho de 2017]. Disponível na *Internet*: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0202014-de-30122014-pdf.aspx>.

Anexo I

A Tabela 2 ilustra alguns exemplos da recolha de revertências feita no dia 23 de janeiro de 2017, em relação ao serviço de Cirurgia – Internamento. Na tabela, estão indicados todos os medicamentos enviados pelos Serviços Farmacêuticos para cada uma das camas referidas. Além disso, encontra-se identificado se essa medicação se tratava de medicação normal ou para administrar em SOS, bem como a indicação interna relativamente a esse aspeto, ou seja, se é para enviar todas as unidades que são prescritas em SOS, se é para enviar apenas metade da quantidade ou se não é para enviar, dado que normalmente os serviços têm *stocks* próprios desses medicamentos. Por último, tendo em conta se o medicamento foi administrado ou não, tiraram-se algumas conclusões.

Tabela 2 – Exemplos de revertências do serviço de Cirurgia-Internamento do dia 23 de janeiro de 2017.

CAMA	DESIGNAÇÃO	SOS	QT. ENV.	QT. REVERT.	DISP. UNIDOS E (SOS)	ADMINISTRADO	OBSERVAÇÕES
1	Midazolam 15 mg/3 ml I.V	Não	1	1	Sim	Sim	Retirado do stock
	Hidroxizina 25 mg cp. Revet.	Não	1	1		Sim	Retirado do stock
	Bromazepam 3 mg cp.	Não	1	1		Sim	Retirado do stock
	Enoxaparina 40 mg/ 0,4 ml inj.	Não	1	1		Sim	Retirado do stock
2	Ipratrópio 0,5 mg + Salbutamol 3 mg	Não	3	1		Sim	1 toma retirada do stock
3	Metamizol Magnésico 575 mg cáps.	Sim	2	2	Sim	Não	
6	Ipratrópio Brometo 0,125 mg/ml	Não	3	2		2 tomas	1 cassete e 1 stock
7	Paracetamol 500 mg cp.	Não	6	4	Sim	1 toma	Doente recusou 2 tomas
8	Metamizol Magnésico 575 mg cáps.	Sim	1	1	Sim	Não	
	Paracetamol 500 mg cp.	Sim	4	2	Sim	Sim	2 cassete + 2 stock
9	Metamizol Magnésico 575 mg cáps.	Sim	3	3	Sim	1 toma	Retirado do stock
	Nifedipina 10 mg cáps. Moles	Sim	1	1		Não	
	Paracetamol 500 mg cp.	Sim	4	2	Sim	1 toma	
9	Cefradina 500 mg cáps.	Não	3	1		2 tomas	
	Metamizol Magnésico 575 mg cáps.	Sim	2	1	Sim	1 toma	
	Paracetamol 500 mg cp.	Não	6	4	Sim	Não	Ficaram 2 un. no serviço; doente recusou toma

10	Bromazepam 3 mg cp.	Não	1	1		Não	Doente recusou
	Droperidol 2,5 mg/ml I.V.	Não	2	2	Reduzir a metade		
	Esomeprazole 40 mg I.V.	Não	1	1		Não	
	Metamizol Magnésico 2 g/5 ml	Não	3	2	Reduzir a metade	Não	Serviço ficou com 1 un.
	Midazolam 15 mg/3 ml I.V	Não	1	1	Sim	Não	
	Tramadol 100 mg/2 ml INJ	Não	2	2	Não	Não	Doente recusou
11	Midazolam 15 mg/3 ml I.V	Não	1	1	Sim	Sim	Retirado do stock
12	Esomeprazole 20 mg cáp.	Não	1	1		Sim	Retirado do stock
	Metamizol Magnésico 2 g/5 ml	Sim	2	2	Reduzir a metade	Não	
	Midazolam 15 mg/3 ml I.V	Não	1	1	Sim	Sim	Retirado do stock
	Parecoxib 40 mg INJ	Não	2	1		1 toma	
15	Metamizol Magnésico 2 g/5 ml	Não	2	2	Reduzir a metade	Não	
	Nifedipina 10 mg cáps. Moles	Sim	1	1		Não	
	Paracetamol 500 mg cp.	Não	8	6	Sim	1 toma	Doente recusou
19	Metamizol Magnésico 575 mg cáps.	Sim	3	2	Sim	Não	Serviço ficou com 1 un.
	Paracetamol 500 mg cp.	Sim	4	4	Sim	Não	
21	Metamizol Magnésico 575 mg cáps.	Sim	3	2	Sim	Não	Serviço ficou com 1 un.
	Paracetamol 500 mg cp.	Sim	4	4	Sim	Não	
22	Metamizol Magnésico 2 g/5 ml	Sim	3	1	Reduzir a metade	Não	Serviço ficou com 2 un.
28	Cálcio, Gloconato 1 g 10%	Sim	2	2		Não	
	Metamizol Magnésico 2 g/5 ml	Não	3	2	Reduzir a metade	1 toma	Doente recusou 2 tomas
	Ondansetron 8 mg/4 ml INJ.	Não	1	1		Não	
	Supl. Hiperclórico + Hiperproteico	Não	2	2		Não	
	Vancomicina 1 g INJ.	Não	2	5		2 tomas	Ao todo a doente tomou 8 vancomicinas, foram enviadas para o serviço 9 un. O doente fazia 500 mg de 12h/12h

Tendo em conta estes e outros dados, foi possível concluir que no serviço de Ginecologia foram enviados alguns medicamentos em SOS que não seriam para enviar em situação de SOS. Alguns destes não foram depois administrados e vieram revertidos para os Serviços Farmacêuticos.

Também se verificaram casos em que a medicação foi enviada, mas o medicamento que foi administrado ao doente foi retirado do *stock* próprio do serviço, pois essa medicação acabou por vir revertida no dia seguinte.

No serviço de Cirurgia – Internamento verificaram-se questões semelhantes às anteriores. Verificou-se, também, que em relação a determinados medicamentos, com posologia superior a uma vez ao dia, houve situações em que uma unidade era retirada da gaveta enviada e outra unidade era retirada do *stock* próprio do serviço de Cirurgia.

Noutros casos, enviaram-se as unidades necessárias de um medicamento e vieram revertidas menos unidades do que as enviadas, apesar de nenhuma delas ter sido administrada ao doente. Nestes casos, essas unidades poderão ter ficado para o *stock* do serviço.

Relativamente ao serviço de Cuidados Paliativos verificaram-se novamente todas estas questões, assim como no serviço de Medicina-Internamento e Radioterapia.

Em relação aos serviços de Braquiterapia, Urologia, Cirurgia da Cabeça e Pescoço e Oncologia Médica não foi possível fazer o tratamento dos dados.

Na minha opinião, a resolução destas questões envolverá os farmacêuticos, os TDTs e a equipa de enfermagem, os profissionais de saúde responsáveis pela administração dos medicamentos aos doentes.

Aos farmacêuticos caberá, talvez, tentar chegar a um acordo com os responsáveis de cada serviço, em relação aos medicamentos que se enviam ou não em SOS, tendo em conta o nível de *stock* mínimo de cada medicamento nesses serviços. Além disto, é importante sensibilizar a enfermagem para que deem preferência à medicação que vai na gaveta, em relação à do *stock* do serviço e para que não deixem acumular medicação de um doente e depois façam as revertências todas no final do tratamento. Por fim, é importante garantir, em cada validação da prescrição de um doente, que não vai ser enviada medicação que não é necessário enviar em caso de SOS.

Por outro lado, os TDTs, que são os responsáveis por fazer o levantamento da medicação que volta nas gavetas, devem garantir que cada medicamento é revertido corretamente e em relação ao doente correspondente à gaveta.

Anexo 2

Na Tabela 3 encontram-se alguns exemplos de medicamentos cedidos em ambulatório pelos Serviços Farmacêuticos do IPOCFG, E.P.E., bem como se deve atuar em caso de omissão da toma de uma das doses. Dado que a lista completa é muito extensa, encontram-se apresentados apenas alguns exemplos.

Tabela 3 – Exemplos de medicamentos cedidos em ambulatório pelos Serviços Farmacêuticos do IPOCFG, E.P.E. bem como a indicação de como proceder em caso de omissão da toma de uma das doses.

FÁRMACO	POSOLOGIA	OMISSÃO DE DOSE
ABIRATERONA 250 MG, COMP.	Tomar 4 comprimidos por dia como dose única (1 000 mg), pelo menos 2 horas após a ingestão de alimentos. Deve ser tomado com uma dose baixa de prednisona ou prednisolona (10 mg por dia).	Em caso de omissão de uma dose diária o tratamento deverá prosseguir no dia seguinte com a dose diária habitual.
ANASTROZOL 1 MG COMP. REVESTIDO	Adultos (incluindo idosos): um comprimido de 1 mg para ser tomado por via oral uma vez por dia, à mesma hora.	Em caso de omissão de uma dose diária continue simplesmente a tomar os comprimidos da maneira habitual. Não tome uma dose a dobrar para compensar uma dose que se esqueceu de tomar.
AXITINIB 5 MG COMP.	A dose inicial recomendada é 5 mg 2 vezes por dia, tomada aproximadamente de 12 em 12 horas. A dose pode ser ajustada de acordo com a resposta do doente.	Em caso de omissão de uma dose diária continue simplesmente a tomar os comprimidos da maneira habitual. Não tome uma dose a dobrar para compensar uma dose que se esqueceu de tomar.
BICALUTAMIDA 150 MG COMP. REVEST. BICALUTAMIDA 50 MG COMP. REVEST.	Tomar 1 comprimido diariamente com água, sempre à mesma hora.	No caso de se esquecer de tomar o seu medicamento, tome-o logo que se lembrar e depois tome a dose seguinte à hora habitual. Não tome uma dose a dobrar para compensar um comprimido que se esqueceu de tomar.
CAPECITABINA 150 MG COMP. REVEST. CAPECITABINA 500 MG COMP. REVEST.	Tomado duas vezes por dia em doses entre 625 e 1250 mg por metro quadrado de área de superfície corporal. Os comprimidos do devem ser tomados com água, 30 minutos após uma refeição.	Em caso de omissão de uma toma não tome a dose esquecida nem faça uma toma dupla para compensar a que se esqueceu. Continue o horário habitual das suas doses.
CIPROTERONA 100 MG COMP.	Um comprimido de 100 mg duas a três vezes por dia (= 200 - 300 mg). Os comprimidos devem ser tomados após as refeições, com um pouco de líquido.	Não tome uma dose a dobrar para compensar um comprimido que se esqueceu de tomar. O doente deve tomar a dose prescrita habitual no dia seguinte.
COBIMETINIB 20 MG COMP.	É administrado numa dose recomendada de 60 mg por dia (3 comprimidos de 20 mg). O tratamento é administrado em ciclos de 28 dias: os comprimidos são tomados durante 21 dias consecutivos, aos quais se seguem um intervalo de 7 dias.	Se uma dose for omitida, pode ser tomada até 12 horas antes da dose seguinte, de modo a manter o esquema de administração diário.
COBIMETINIB 20 MG COMP.	É administrado numa dose recomendada de 60 mg por dia (3 comprimidos de 20 mg). O tratamento é administrado em ciclos de 28 dias: os comprimidos são tomados durante 21 dias consecutivos, aos quais se seguem um intervalo de 7 dias.	Se uma dose for omitida, pode ser tomada até 12 horas antes da dose seguinte, de modo a manter o esquema de administração diário.

CRIZOTINIB 250 MG CAPS	A dose recomendada é de 250 mg duas vezes por dia.	Se falhar uma dose, esta deve ser tomada assim que o doente se lembrar, a não ser que faltem menos de 6 horas até à próxima dose. Neste caso o doente não deve tomar a dose esquecida. Os doentes não devem tomar duas doses ao mesmo tempo para compensar uma dose que se esqueceram de tomar.
ERLOTINIB 100 MG COMP. ERLOTINIB 150 MG COMP. ERLOTINIB 25 MG COMP.	No cancro do pulmão, a dose diária recomendada é de 150 mg e, no cancro pancreático, é de 100 mg. O erlotinib deve ser tomado pelo menos uma hora antes ou duas horas depois da ingestão de alimentos. Os doentes que fazem esta terapêutica devem deixar de fumar, pois nos fumadores as concentrações do medicamento no sangue podem diminuir.	Não tome uma dose a dobrar para compensar uma dose que se esqueceu.
EVEROLIMUS 10 MG COMP. EVEROLIMUS 5 MG COMP.	A dose recomendada é de 10 mg uma vez ao dia. Os comprimidos devem ser engolidos inteiros, à mesma hora todos os dias, e nunca devem esmagados ou mastigados. Devem ser tomados, de forma regular, com ou sem alimentos.	Caso seja omitida uma dose, o doente não deve tomar uma dose adicional. A terapêutica deve continuar com a administração da dose seguinte conforme o esquema posológico prescrito.
EXEMESTANO 25 MG COMP. REVEST.	O exemestano deve ser tomado após uma refeição, aproximadamente à mesma hora todos os dias. A dose recomendada é de um comprimido de 25 mg por dia.	No caso de se ter esquecido de tomar o seu comprimido, tome-o assim que se lembrar. Se for quase a altura de tomar a dose seguinte, tome-a à hora habitual. No entanto, nunca tome uma dose a dobrar para compensar um comprimido que se esqueceu de tomar.
IMATINIB 100 MG COMP. REVEST. IMATINIB 400 MG COMP. REVEST.	A dose prescrita deve ser administrada oralmente, com uma refeição e um grande copo de água para minimizar o risco de irritação gastrointestinal. As doses de 400 mg ou 600 mg devem ser administradas uma vez por dia, enquanto que a dose de 800 mg deve ser administrada como 400 mg duas vezes por dia, de manhã e à noite.	Em caso de omissão de uma dose tome-a assim que se lembrar. No entanto se estiver quase na hora da próxima dose, salte a dose esquecida. De seguida, continue com o horário de administração normal. Não tome uma dose a dobrar para compensar uma dose que se esqueceu de tomar.
TAMOXIFENO 20 MG COMP.	A dose recomendada é de 20 mg a 40 mg administrados em toma única diária ou duas vezes ao dia, por via oral.	Caso se tenha esquecido de tomar uma dose, retome a administração do medicamento logo que seja possível. No entanto não tome uma dose a dobrar para compensar a dose que se esqueceu de tomar.
TEMOZOLAMIDA 5 MG CAPS. TEMOZOLAMIDA 20 MG CAPS. TEMOZOLAMIDA 100 MG CAPS. TEMOZOLAMIDA 250 MG CAPS.	A dose recomendada depende de vários fatores e varia entre 75 e 200 mg por metro quadrado de superfície corporal, uma vez por dia. As cápsulas de temozolamida têm de ser tomadas com alimentos.	Caso se tenha esquecido de tomar uma dose, tome essa dose o mais cedo possível, ainda no próprio dia se possível. No entanto, nunca tome uma dose a dobrar para compensar uma toma que se esqueceu, a não ser por indicação do médico.

CAPÍTULO II

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

(Farmácia São José)

Abreviaturas

CHUC – Centro Hospitalar Universitário de Coimbra

DCI – Denominação Comum Internacional

IPOCFG, E.P.E. – Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E.

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

MSRM – Medicamento Sujeito a Receita Médica

SNS – Serviço Nacional de Saúde

I. Introdução

De entre todas atividades que integram o ato farmacêutico, a área da farmácia comunitária corresponde ao espaço de maior interação direta entre o farmacêutico e a sociedade, onde este exerce maior influência enquanto agente de saúde pública. Além disto, atualmente, a farmácia assume-se como o primeiro local ao qual a sociedade recorre perante dúvidas relacionadas com a sua saúde ou com a sua terapêutica, estando o farmacêutico no centro dessa interação. Por outro lado, as farmácias são o último local de contacto entre um profissional de saúde e o utente, antes deste último iniciar uma determinada terapêutica, colocando o farmacêutico numa posição determinante para o sucesso das terapêuticas prescritas.

Este estágio em farmácia comunitária surge, assim, no seguimento da Diretiva 2013/55/EU, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de novembro de 2013 que, no artigo 44º, ratifica seis meses de estágio curricular em farmácia comunitária e/ou hospitalar para a formação de acesso ao título de farmacêutico [1]. Posto isto, no âmbito da conclusão do Mestrado Integrado em Ciências farmacêuticas (MICF), realizei um estágio na Farmácia São José, em Coimbra, entre o dia 10 de abril e o dia 22 de julho de 2017, sob orientação do Dr. Paulo Monteiro.

A realização de um estágio em farmácia comunitária acaba, assim, por fazer parte do processo de aprendizagem de qualquer futuro farmacêutico, permitindo-lhe aplicar todos os conhecimentos apreendidos durante o decorrer do curso e, experienciar, num contexto profissional, o contacto com os utentes e o trabalho levado a cabo diariamente por um farmacêutico, tendo como principal foco o bem-estar e a saúde dos utentes.

O presente relatório retrata a experiência que foi o estágio na Farmácia São José, uma farmácia de referência na cidade de Coimbra. Assim, apresento retrospectivamente esta experiência através de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities e Threats*), que foca os pontos fortes a manter, os pontos fracos a melhorar, as oportunidades a ter em vista e as ameaças que se devem tentar ultrapassar.

2. Análise SWOT

Uma análise SWOT é uma ferramenta de gestão muito utilizada, que permite avaliar uma dada atividade, quer numa vertente interna, em relação aos pontos fortes (*Strengths*) e aos pontos fracos (*Weaknesses*), quer numa vertente mais externa, relativamente a

oportunidades (*Opportunities*) e a ameaças (*Threats*). Vulgarmente, este tipo de análise é conhecido pelo acrónimo SWOT.

Desta forma, apresento a minha análise SWOT relativa a este estágio em farmácia comunitária, onde abordo os aspetos que considero que valorizaram o meu estágio, as dificuldades sentidas durante a realização do mesmo, mas também as oportunidades e as ameaças que reconheci. Na Tabela I encontram-se enumerados aqueles que considero os pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças.

Tabela I – Análise SWOT do meu estágio curricular em Farmácia Comunitária.

	PONTOS FORTES	PONTOS FRACOS
FATORES INTERNOS	<ul style="list-style-type: none"> • Localização e horário de funcionamento da farmácia • Equipa técnica • Dermocosmética • Fidelização dos utentes • Preparação de medicamentos manipulados • Gestão e dinamização da farmácia • Conferência de receituário e receção de encomendas • Aconselhamento farmacêutico 	<ul style="list-style-type: none"> • Conteúdos programáticos do MICF • Associação entre os nomes comerciais de medicamentos e os princípios ativos
FATORES EXTERNOS	OPORTUNIDADES	AMEAÇAS
	<ul style="list-style-type: none"> • Receitas eletrónicas desmaterializadas • Formações • Serviços disponibilizados pela farmácia 	<ul style="list-style-type: none"> • Locais de venda de MNSRM • Adesão dos utentes aos medicamentos genéricos

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Localização e horário de funcionamento da farmácia

A Farmácia São José encontra-se localizada na Avenida Calouste Gulbenkian, Lote 5, R/C, em Coimbra e encontra-se em funcionamento de segunda a sexta-feira, das 8h30 às 21h e aos sábados das 9h às 20h. A sua grande proximidade em relação ao Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), à maternidade Bissaya Barreto e ao Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E. (IPOCFG, E.P.E.) fez com que, durante este estágio, tivesse tido contacto com uma grande diversidade de utentes, com histórias clínicas e terapêuticas muito variadas.

Além disso, o contexto socioeconómico de Celas, permitiu contactar com utentes de diferentes faixas etárias, com diferentes realidades económicas, estudantes, utentes de passagem vindos do CHUC, utentes vindo de inúmeros consultórios privados e doentes polimedicados, uma realidade em relação à qual nem todas as farmácias têm acesso, permitindo-me desenvolver diferentes abordagens de contacto com utentes.

2.1.2. Equipa técnica

A Farmácia São José apresenta uma extensa equipa técnica, constituída por quinze profissionais efetivos, contemplando farmacêuticos, técnicos de farmácia e um contabilista. Perante uma equipa tão diversificada, é essencial a cooperação que existe entre todos eles, de forma a garantirem o serviço de excelência prestado aos utentes que é tão característico desta farmácia.

Durante o estágio, tive a oportunidade de acompanhar diariamente cada um dos profissionais da farmácia, tendo contactado de perto com as mais variadas tarefas, que vão desde a gestão de encomendas diretas a laboratórios até ao aconselhamento ao balcão. Durante todas essas etapas de aprendizagem tenho de agradecer a incansável paciência e partilha de conhecimentos por parte de toda a equipa. Desde o primeiro minuto que se mostraram totalmente disponíveis para me ajudar e ensinar todas as funções de um farmacêutico comunitário, de forma a que a minha aprendizagem fosse o mais vasta possível.

Cada membro da equipa tem funções especializadas, nomeadamente, gestão de encomendas e de produtos, dinamização e marketing, receção de encomendas, aconselhamento dermocosmético, preparação de medicamentos manipulados, conferência do receituário, entre outras. Esta especificação de tarefas acaba por ser um ponto positivo, e acabou por ser importante no processo de aprendizagem, uma vez que para cada questão, sabia sempre a quem recorrer.

Por último, é de salientar a presença constante na farmácia do Dr. Paulo Monteiro, proprietário e Diretor Técnico. A sua presença diária na farmácia foi imprescindível para a minha aprendizagem, quer por ser um exemplo na prática da sua profissão, quer pelo conhecimento que tem da sua equipa e pela confiança que lhes transmite.

2.1.3. Dermocosmética

A Farmácia São José trabalha com uma grande variedade de produtos cosméticos, desde produtos mais acessíveis a produtos mais dispendiosos, espelhando, de certa forma, o seu público alvo. Neste sentido, é essencial o conhecimento das marcas e dos produtos, para se poder aconselhar o cosmético mais indicado para cada utente.

Sem dúvida que toda a aprendizagem nesta área foi um dos pontos fortes, uma vez que me permitiu descobrir uma área com a qual ainda não tinha tido muito contacto. Neste aspeto, foram essenciais todas as formações em que tive a oportunidade de participar, quer na farmácia, quer fora da farmácia, bem como o auxílio dos membros da equipa técnica.

2.1.4. Fidelização dos utentes

Um utente satisfeito é um utente fidelizado. É com base neste lema que todos os dias se trabalha na Farmácia São José, no sentido de prestar os melhores cuidados e aconselhamentos a todos os utentes da farmácia, sendo esta uma das preocupações constantes de toda a equipa.

Durante o estágio tive a perceção de que esta farmácia tem um grande grupo de utentes fidelizados, que muitas vezes chegam mesmo a procurar membros específicos da equipa técnica, um ponto forte no meu ponto de vista. Uma boa base de utentes fidelizados é muito importante para a saúde financeira de uma farmácia, e espelha a qualidade de serviço que lá é prestado.

Não posso deixar de salientar a grande abertura, por parte da maioria dos utentes, durante os meus atendimentos ao balcão, dado que por vezes existe um estigma em relação aos estagiários. No entanto, na maioria das vezes, houve recetividade por parte dos utentes para que fosse eu a atendê-los.

2.1.5. Preparação de medicamentos manipulados

Os medicamentos manipulados assumem um papel importante em patologias específicas, como a sarna, em situações de ajuste de dose, muito comuns em pediatria, ou no sentido de obter preparações que ainda não existam no mercado, quer devido à sua baixa rentabilidade económica, quer à fraca estabilidade dos seus constituintes. Apesar de ser cada vez menos frequente, a Farmácia São José destaca-se pela grande quantidade de manipulados que faz semanalmente.

A gestão dos medicamentos manipulados é feita recorrendo ao *software* SoftGaleno[®], que permite fazer a gestão de *stocks* das matérias-primas, dos clientes e fornecedores, calcula o preço dos manipulados, faz o registo das quebras, indica o prazo de validade das matérias-primas e mantém atualizados os boletins de segurança das matérias-primas.

Durante o estágio, tive a oportunidade de poder colaborar na preparação de vários medicamentos manipulados, nomeadamente na preparação de cápsulas de perclorato de potássio, numa dosagem de 450 mg. Estas cápsulas são utilizadas para facilitar a eliminação de um contraste utilizado em exames médicos de medicina nuclear. A ficha de preparação deste

manipulado encontra-se no Anexo I. Para se proceder à preparação destas cápsulas utilizou-se o método algébrico para se chegar à massa de diluente necessária para a preparação de todas as cápsulas, de forma a garantir, no final, o mesmo teor de substância ativa em todas elas.

Por fim, em relação aos manipulados, foi desde logo transmitida a importância de prestar todos os aconselhamentos relacionados com a utilização deste tipo de medicamentos, nomeadamente em relação ao prazo de validade, posologia, modo de utilização e condições especiais de conservação.

2.1.6. Gestão e dinamização da farmácia

Um dos grandes pontos fortes deste estágio foi, sem dúvida, toda a aprendizagem relacionada com o funcionamento do *backoffice* da farmácia. Desde o início que pude auxiliar no desempenho de inúmeras tarefas como conferência e receção de encomendas, armazenamento dos medicamentos, gestão de devoluções, organização de lineares, gestão de campanhas, conferência de faturas, revisão do receituário, contagem física de stocks, entre outros. O facto de poder ter desempenhado estas tarefas, logo desde o início do estágio, permitiu que entendesse melhor a forma como se processa o funcionamento da farmácia, bem como toda a dinâmica do circuito do medicamento. Estas tarefas são fundamentais para o bom funcionamento de uma farmácia.

Em termos de dinamização da farmácia e dos seus produtos, também acompanhei o destaque que se ia dando aos produtos sazonais e/ou abrangidos por campanhas especiais, que eram expostos em zonas quentes, isto é, com maior visibilidade, de acordo com as regras do marketing. Assim, pude cooperar várias vezes na manutenção das gôndolas e dos lineares, bem como presenciar várias campanhas de saúde pública e campanhas publicitárias que se realizam na farmácia, servindo tanto para consciencializar os utentes em relação a alguns cuidados de saúde, como para dar um *input* ao volume de vendas de determinadas classes de produtos.

2.1.7. Conferência de receituário e receção de encomendas

A conferência do receituário é uma tarefa de extrema importância para uma farmácia, uma vez que um simples erro pode comprometer o pagamento de um dado valor de participação, quer por parte do Estado, quer por parte de outras entidades participadoras.

Durante o estágio pude contactar com diversos tipos de receitas e diversos tipos de organismos de participação. Antes de serem conferidas pela farmacêutica responsável,

todas as receitas eram previamente conferidas pelos estagiários, de forma a que estivéssemos atentos a todo o tipo de erros que são cometidos e, assim, minimizar os enganos ao balcão. Considero este um ponto muito forte do meu estágio, porque realmente é uma aprendizagem em que a prática tem um papel muito importante.

Desde o início do estágio que também contactei de perto com todo o processo de receção de encomendas, quer as encomendas diárias, quer as encomendas diretas que a farmácia faz aos diversos laboratórios. Considero este um processo muito importante para o bom funcionamento da farmácia, pelo que foi bastante proveitoso perceber e compreender a gestão que tem de ser feita todos os dias para que estejam disponíveis, em tempo útil, os produtos e os medicamentos que os utentes necessitam. Assim, tive oportunidade de realizar tarefas como conferência de encomendas, receção de encomendas no sistema informático e gestão de produtos e medicamentos reservados para utentes específicos. Pude, também, acompanhar, por diversas vezes, o processo de criação de encomendas diárias para armazenistas e encomendas para determinados laboratórios, sendo para isso necessário fazer uma gestão rigorosa entre o *stock* dos medicamentos e os seus resumos de vendas.

2.1.8. Aconselhamento farmacêutico

O papel do farmacêutico, ao nível da farmácia comunitária, é muito mais do que o ato de dispensa de medicamentos. Implica ir ao encontro dos problemas e das dúvidas do utente e esclarecê-lo da melhor forma relativamente à sua terapêutica. As funções do farmacêutico passam, assim, por educar o utente para questões de saúde pública, ceder os medicamentos e acompanhar o seu processo terapêutico. Todas estas funções são um desafio diário, que implicam um conhecimento muito abrangente de várias matérias.

Deste modo, o maior desafio é sem dúvida o atendimento ao balcão e o aconselhamento farmacêutico. Desde o início do estágio que tive oportunidade para acompanhar o atendimento ao público de vários elementos da equipa técnica, tendo esta aprendizagem sido essencial para os meus próprios atendimentos. Este processo foi essencial para solidificar os meus conhecimentos em relação ao programa informático *Sifarma 2000*[®], para começar desde logo a associar os nomes comerciais aos diferentes princípios ativos e para observar os aconselhamentos farmacêuticos prestados aos utentes. Assim, apesar da falta de confiança inicial, facilmente, com o apoio da equipa técnica, iniciei o atendimento ao balcão.

Esta foi, sem dúvida, a tarefa que mais contribui para o meu crescimento enquanto futuro farmacêutico, permitindo-me ter a percepção de que o farmacêutico pode ter um papel preponderante na escolha da terapêutica mais adequada para cada utente. Por exemplo, foram inúmeras as situações em que surgiam utentes com infeções urinárias. Nestas situações, na impossibilidade de lhes ceder um antibiótico, dado que é um medicamento sujeito a receita médica e muitas utentes não tinham prescrição, aconselhei várias vezes um produto a base de arando-vermelho, como o Roter Cystiberry[®]. Trata-se de um dispositivo médico, que ao impedir a fixação do biofilme bacteriano à parede da bexiga, trata e previne infeções urinária provocadas por *E. coli*.

Outro exemplo de um caso que surgia com recorrência era a dor de garganta. Num caso mais específico, uma senhora dirigiu-se à farmácia com queixas de dor de garganta e com o nariz congestionado. Inicialmente, questioneei-a se tinha febre, se sentia dificuldade em engolir, se estava a tomar algum tipo de medicação e se tinha alguma doença que pudesse estar associada, tendo-me respondido negativamente a todas as questões. Deste modo, muito provavelmente, tratava-se de uma situação aguda, para a qual eu podia sugerir algumas medidas para aliviar os sintomas. Assim, para a dor de garganta, uma vez que não parecia haver inflamação, aconselhei as pastilhas antissépticas e anestésicas Strepsils[®], que têm na sua constituição o álcool diclorobenzílico e o amilmetacresol, para tomar (dissolver na boca) a cada duas ou três horas, no máximo durante três dias [2]. Relativamente ao congestionamento nasal, aconselhei o uso de Rhinomer[®], uma solução de água do mar isotónica esterilizada, informando a utente de que, normalmente, são feitas quatro aplicações diárias em cada narina, mas que poderia ser utilizado com a frequência desejada. Além disto, e dado que as medidas não farmacológicas também são importantes, aconselhei a utente a aumentar a ingestão de líquidos e evitar ambientes com fumo.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Conteúdos programáticos do MIFC

Em relação às unidades curriculares do MIFC, sou da opinião que é necessário fazer um ajuste dos conteúdos programáticos, de forma a adequá-los mais à realidade da prática profissional do farmacêutico.

Apesar de considerar que a formação adquirida durante o MIFC é da máxima importância, por vezes senti algumas dificuldades em determinadas áreas e matérias, nomeadamente produtos dietéticos, uma área com bastante expressão ao nível da farmácia comunitária, dado o grande número de utentes que nos procuram por estas questões, mas também ao nível de fármacos que atuam ao nível da fertilidade, preparações de uso

veterinário, dermocosméticos e medicamentos oftálmicos. Apesar de alguns destes conteúdos já serem abordados ao nível do MICF, penso que deveriam ser mais aprofundados, dada a sua relevância e a expressão que têm ao nível da farmácia, permitindo assim que os conhecimentos nestas áreas estejam mais consolidados.

2.2.2. Associação entre nomes comerciais e princípios ativos

Uma das principais dificuldades para qualquer estagiário é a associação entre os nomes comerciais dos medicamentos e os princípios ativos, sendo que eu não fui exceção.

Esta barreira é ultrapassada com a experiência do trabalho diário na farmácia, quer durante o atendimento ao balcão, quer aquando da receção de encomendas e armazenamento dos medicamentos nos locais indicados. Neste aspeto, é muito importante o trabalho de *backoffice*, uma vez que permite ir fazendo essa associação com tempo e sem a pressão de estarmos perante um utente, bem como o à-vontade e a prática ao nível da utilização do sistema informático *Sifarma 2000*[®].

Esta questão assume ainda mais importância quando os próprios utentes não sabem o medicamento que tomam normalmente, tendo assistido a algumas situações em que, também devido à minha falta de experiência, foi complicado identificar o medicamento que o utente pretendia.

Neste sentido, e apesar das prescrições médicas serem na sua maioria feitas por Denominação Comum Internacional (DCI), seria importante, ao longo do MICF, ir introduzindo alguns nomes comerciais, uma vez que são uma realidade durante a vida profissional dos farmacêuticos.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Receitas eletrónicas desmaterializadas

Desde o dia 1 de abril de 2016, através do Despacho n2935-B/2016, de 25 de fevereiro, a receita sem papel adquiriu um caráter obrigatório para todas as entidades do Serviço Nacional de Saúde (SNS) [3].

A receita sem papel, além do número da receita, inclui um código de acesso e dispensa e um código relativo ao direito de opção, fornecidos apenas ao utente, para validação da dispensa dos fármacos. Com este tipo de receita, o utente pode receber os códigos indicados no seu telemóvel ou *email*, e tem a liberdade de aviar todos ou apenas uma parte dos medicamentos prescritos, numa ou em várias farmácias diferente.

Esta ação, de desmaterialização do receituário, tem como objetivos principais a eliminação do suporte de papel, o aumento da conveniência do acesso à medicação por

parte dos utentes, o aumento da segurança da prescrição por parte dos prescritores, o combate ao desperdício no SNS e a diminuição da burocracia relativamente à conferência do receituário, quer por parte da farmácia, quer por parte das entidades.

Apesar de ter sido uma mudança iniciada em 2016, ainda há utentes que mostram alguma apreensão em relação a estas receitas, se bem que a maioria já está completamente por dentro do mecanismo. Ainda assim, o facto do utente ter na sua posse apenas os códigos de acesso e de direito de opção, não lhe é possível ver quais os medicamentos que estão contemplados na receita, nem quantas unidades de cada ainda tem disponíveis para aviar, por exemplo. Deste modo, considero este facto como o aspeto negativo das receitas sem papel, principalmente para a população mais idosa, que muitas vezes são utentes polimedicados, pelo que se torna difícil a gestão de toda a terapêutica. Neste sentido, é fundamental o papel do farmacêutico, de forma a esclarecer todas as dúvidas ao utente.

2.3.2. Formações

Durante a realização deste estágio tive a oportunidade de participar em inúmeras formações, quer em relação a produtos de cosmética, quer em relação a dispositivos médicos ou suplementos alimentares. Além de toda a aprendizagem do dia a dia, semanalmente havia sempre formações, tanto na farmácia, como fora da farmácia.

No meu ponto de vista, estas formações são sobretudo importantes para se colmatarem algumas dúvidas em relação a produtos que não conhecemos tão bem, de forma a responder às necessidades e às dúvidas dos utentes da melhor forma, pois só assim podemos acrescentar valor ao utente e a farmácia.

2.3.3. Serviços disponibilizados pela farmácia

A Farmácia São José tem ao dispor dos seus utentes uma série de serviços, que além de contribuírem para uma dinamização maior do espaço da farmácia, trazem também mais valias para os utentes.

Por diversas vezes, ao longo do estágio, pude observar e participar na medição de parâmetros bioquímicos, nomeadamente medição da tensão arterial, da glicémia e do colesterol total, um serviço realizado pelos farmacêuticos e restante equipa técnica.

Além destes serviços, a farmácia tem disponível um serviço de consultas de nutrição e de podologia, dois serviços que além de acrescentarem valor ao utente, contribuem muito para o valor da farmácia.

Ainda assim, considero que seja importante explorar outro tipo de serviços farmacêuticos, ou seja, revisão da medicação, organização semanal da medicação e

acompanhamento farmacoterapêutico, serviços bastante importantes e que podem ser extremamente úteis principalmente para a população mais idosa.

2.4. Ameaças

2.4.1. Locais de venda de MNSRM

No nosso país, o mercado dos Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) foi liberalizado em 2005, com a autorização de venda destes medicamentos fora das farmácias e o estabelecimento de um regime de preços livre. Esta liberalização levou a uma grande procura de MNSRM noutros locais autorizados, que não a farmácia, por serem, à partida, mais baratos. Por conseguirem negociar um grande volume de compras, as grandes superfícies comerciais, conseguem melhores condições comerciais e, dessa forma, praticam preços mais apelativos para os utentes. No entanto, existe um serviço que diferencia as farmácias, em relação a estes locais. O aconselhamento por parte do farmacêutico pode ser um fator chave na escolha das farmácias em detrimento desses postos de venda de MNSRM, prevenindo possíveis erros relacionados com a automedicação.

Esta liberalização da venda de MNSRM constitui uma ameaça em termos económicos para as farmácias, aliada à descida do preço dos Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM), tendo levado a uma diminuição da rentabilidade das farmácias, nos últimos anos.

No sentido de contradizer esta tendência, a farmácia pode ter uma ação diferenciadora através do aconselhamento e conhecimento técnico do farmacêutico. Por outro lado, para tornar as farmácias mais apelativas em termos comerciais, surgiu o Cartão Saúde, uma excelente estratégia com grande adesão por parte dos utentes.

2.4.2. Adesão dos utentes aos medicamentos genéricos

Um medicamento genérico é um medicamento com a mesma substância ativa, forma farmacêutica e dose ou concentração, e com a mesma indicação terapêutica que o medicamento de marca/inovador que lhe serviu de referência, tendo demonstrado que atua no organismo humano da mesma forma [4]. Perante uma prescrição por DCI, o farmacêutico tem o dever de questionar o utente quanto à sua preferência em relação ao medicamento de marca ou, quando aplicável, ao medicamento genérico.

Durante o decorrer do estágio, deparei-me com vários utentes que ainda não aderiram ou que têm alguns complexos em relação aos genéricos, quer por uma questão de opção, mas também por uma questão de puro desconhecimento. Neste sentido, é muito importante o papel do farmacêutico. Tendo em conta o tipo de utente que tem à sua frente, deve tentar explicar da melhor forma possível o que são estes medicamentos, uma vez que,

dado que o seu preço é por norma mais reduzido, acabam por ser uma mais valia para a carteira dos utentes e para própria sustentabilidade do SNS.

3. Conclusão

A realização deste estágio foi uma das etapas mais desafiantes do MICF. O facto de diariamente poder contactar com os utentes, o público-alvo da ação farmacêutica, e ter a possibilidade de os ajudar e esclarecer as suas dúvidas em relação a questões relacionadas com a sua saúde, foi das maiores aprendizagens de todo este percurso. E neste aspeto, estou certo que a Farmácia São José foi um ótimo local para poder desenvolver estas capacidades, quer por todos os conhecimentos teóricos e práticos que adquiri, quer porque me permitiu consolidar os conhecimentos apreendidos durante o MICF.

Só estando diariamente numa farmácia é que se consegue, realmente, compreender o peso e a importância de um farmacêutico na sociedade, bem como o relevo das suas funções. Além de ser o profissional de saúde mais especializado na área do medicamento, muitas vezes, acaba por ser o primeiro profissional de saúde a ser procurado numa situação de doença. Há utentes que, perante um problema de saúde, dirigem-se primeiro à farmácia antes de recorrerem ao centro de saúde. Isto é a prova de que a sociedade confia no trabalho e na opinião do farmacêutico.

Ao nível da farmácia comunitária, este estágio ajudou-me a clarificar a realidade da profissão e de que forma é que os vários setores farmácia estão conectados. Apesar da farmácia ser um local de prestação de serviços de saúde e de venda de medicamentos, na sua base é um negócio. Neste sentido, o estágio foi muito importante para perceber o balanço que deve existir em relação à ética profissional, de forma a os valores do negócio nunca se sobreponham aos valores da profissão farmacêutica. Neste aspeto, o objetivo primordial é cuidar da saúde do utente e satisfazer as suas necessidades, tentando também acrescentar valor à farmácia.

Por último, não posso deixar de agradecer novamente ao Dr. Paulo Monteiro e à sua equipa por me terem proporcionado este estágio e por me terem acompanhado nesta jornada, por todos os conhecimentos transmitidos e por toda a disponibilidade.

Referências Bibliográficas

1. **Diretiva 2013/55/UE do Parlamento Europeu e do Conselho.** *Jornal Oficial da União Europeia*. [Acedido a 2 de junho 2016]. Disponível na Internet: http://www.ordemfarmaceuticos.pt/xFiles/scContentDeployer_pt/docs/articleFile1127.pdf.
2. INFARMED - **Folheto Informativo Strepsils® Menta Fresca.** [Acedido a 29 de julho de 2017]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=49976&tipo_doc=fi.
3. **Despacho normativo nº2935-B/2016, de 25 de fevereiro.** [Acedido a 3 de agosto de 2017]. Diário das República. Disponível na Internet: <https://dre.pt/application/file/73726006>.
4. INFARMED - **Medicamentos Genéricos.** [Acedido a 28 de agosto de 2017]. Disponível na Internet: http://www.infarmed.pt/documents/15786/1410451/MG_Maxima_Confianca_Outubro_2015.pdf/065d93db-311b-4bab-81e7-f0d8813624ab.

Anexo I

A Fig. I corresponde à ficha de preparação do manipulado: cápsulas de perclorato de potássio 450 mg.

FARMÁCIA S. JOSÉ

Ficha de Preparação do Manipulado
Cápsulas de Perclorato de Potássio 450mg

Ciente:

Forma Farmacêutica: CAPSULA
 Data de Preparação: 30/06/2017 Prazo Validade: 27/12/2017
 Nº Lote: 28.VL.17 Registo Copiador: 1.356
 Condições de Conservação: Em local seco e fresco.
 Posologia:
 Qtd. Total Medicamento: 1 X 100,00 uni
 Director Técnico:
 Operador:
 Médico:

Honorários:	4,09 €	Valor Net:	€	Valor PVP
Factor Multiplicativo:	5,00	Valor IVA:	€	
		Valor Total:	€	

Materiais Primas	Usar	Nº Lote	Origem	Qtd. Usada	Unid.	Preço An. s/ IVA	Factor Multiplic.	Preço Mat.prima
Lactose		161771-4	Acofarma	30,00	g	0,03 €	1,50	1,80 €
Perclorato de Potássio		511729	Parreco	45,00	g	0,30 €	1,50	25,74 €
Subtotal								27,34 €

Preparação

Verificar o estado de limpeza e conservação do material e laboratório.
 Pesar 45 g de perclorato de potássio.
 Pesar 30g de lactose.
 Pulverizar os póis separadamente e misturar por diluição geométrica.
 Proceder ao encapsulamento.
 Acondicionar e rotular.
 Limpar e esterilizar o laboratório.

Aparelhagem

Encapsulador Capsum 2000
 Balança eletrónica

Embalagem	Tipo	Nº Lote	Fornecedor	Capac.	Qtd.	Preço	Fact. 30%	Valor Net
Frisco de Vidro 150 mL	EMBAL		Plural	150 mL	1,00	0,64 €	1,20	0,77 €
Cápsulas nº0	EMBAL	151351-CB-1	Acofarma	0,60 mL	*****	0,01 €	1,20	1,68 €
Subtotal								2,45 €

Ensalo	Especificação	Conforme	Utilizador	Assinatura
Cor	Esbranquiçada	<input checked="" type="checkbox"/>		
Odor	Inodoro	<input checked="" type="checkbox"/>		
Aspecto	Homogéneo	<input checked="" type="checkbox"/>		

(Data)

(Assinatura)

Fig. I – Ficha de preparação do manipulado.

CAPÍTULO III

Inflamassomas – da Investigação à Terapêutica

Abreviaturas

AD – Doença de Alzheimer

AINE – Anti-inflamatório Não Esteroide

AP-1 – Proteína Ativadora 1

ASC – Proteína *Speck-like* Associada à Apoptose

BHB – β -hidroxibutirato

BIR – Inibidor de Apoptose do Baculovírus

CAPS – Síndromes Periódicas Associadas à Criopirina

CARD – Domínio de Recrutamento de Caspases

CB2R – Recetor Canabinoide 2

COX-2 – Cicloxigenase 2

DAMP – Padrão Molecular Associado a Sinais de Alarme

DC – Célula Dendrítica

EMCV – Vírus da Encefalomiocardite

FDA – *Food and Drug Administration*

GL – Glicirrizina

HCV – Vírus da Hepatite C

HMGBI – Proteína de Alta Mobilidade com Domínio Box I

HUVEC – Célula Endotelial das Veias do Cordão Umbilical Humano

IFN – Interferão do tipo I

IL-1R – Recetores de Interleucinas da Família I

ILG – Isoliquiritigenina

IMX – ISCOMATRIX

LES – Lupus Eritematoso Sistémico

LLO – Listeriolisina

LP – Lipoxigenase

LPS – Lipopolissacarídeos

LRR – Domínio Rico em Leucina

MAPK – Cinase de Proteína Ativada por Agentes Mitogénicos

MDP – Muramil Dipeptídeo

MDSC – Célula Supressora Derivada da Linhagem Branca

MK – Mevalonato Cinase

MKD – Deficiência da Mevalonato Cinase

MM – Mesotelioma Maligno

mtROS – Espécies Reativas de Oxigénio Mitocondriais

NAIP – Proteína Inibidora da Apoptose Neuronal

NF- κ B – Factor de Transcrição Nuclear *Kappa* B

NLR – Recetor *Nod-like*

NOD – Domínio Central de Oligomerização de Nucleótidos

NSI – Proteína Não Estrutural I

P2X7 – Recetor Purinérgico P2X7

PAMP – Padrão Molecular Associado a Agentes Patogénicos

PD – Doença de Parkinson

PE – Extrato de *Paeonia lactiflora* Pallas

PKR – Proteína Cinase R

PMLC – *Polymeric Multilayer Capsule*

PMN – Célula Polimorfonuclear

Poli (I:C) – Ácido Poli-inosínico : Ácido Policidídico

PRR – Recetor de Reconhecimento de Padrões

PXR – Recetor X do Pregnano

PYD – Domínio Pirina

ROS – Espécies Reativas de Oxigénio

TLR – Recetor Transmembranar *Toll-like*

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TRPM2 – Recetor de Potencial Transitório de Melastatina 2

TTSS – Sistema de Secreção do Tipo III

TXNIP – Proteína de Interação com a Tiorredoxina

X-DNA – *X-shaped* DNA

Resumo

Os inflamassomas são complexos proteicos intracelulares, presentes em várias células do sistema imunitário, que detetam padrões moleculares associados a agentes patogênicos (PAMPs) e padrões moleculares associados a sinais de alarme (DAMPs) e ativam as caspases-1. As caspases-1 são as enzimas responsáveis pela ativação da IL-1 β e da IL-18. Estas citocinas pró-inflamatórias têm um papel central ao nível da ativação de processos inflamatórios e imunológicos. Atualmente, o inflamassoma mais bem caracterizado é o NLRP3.

A ativação dos inflamassomas pode estar envolvida nos mecanismos fisiopatológicos que estão na origem de várias doenças, pelo que se assumem como promissores alvos terapêuticos. Esta monografia pretende apresentar um estudo geral sobre estes complexos proteicos, os seus vários tipos, mecanismos de ativação, bem como apresentar a sua relevância fisiopatológica em determinadas patologias. Além disso, pretende enumerar alguns fármacos não seletivos para o inflamassoma e algumas estratégias novas com ação seletiva na inibição dos mesmos.

Palavras-chave: Inflamassoma; Inflamação; NLRP3; IL-1 β ; IL-18; Terapêutica.

Abstract

Inflammasomes are intracellular protein complexes, present in immune cells, which recognize pathogen associated molecular patterns (PAMPs) and danger associated molecular patterns (DAMPs) and trigger the activation of caspases-1. Caspases-1 are the enzymes responsible for the activation of IL-1 β and IL-18. These two proinflammatory cytokines play a critical role in mediating inflammation and immunity responses. Among others, NLRP3 inflammasome is the best characterized.

Because the activation of inflammasomes may be involved in the onset of various diseases, they appear to be promising therapeutic targets. This monograph aims to present a general study of these protein complexes, their types, the mechanisms of activation, as well as to present their pathophysiological relevance in certain pathologies. In other way, it intends to list some non-selective drugs that act in inflammasome and some new strategies with a selective action on the inhibition of the activation of inflammasomes.

Keywords: Inflammasome; Inflammation; NLRP3; IL-1 β ; IL-18; Therapeutic.

I. Introdução

A inflamação é um mecanismo biológico de defesa inata do organismo humano que se manifesta quando surgem determinados estímulos que são prejudiciais ou que interferem diretamente com a homeostasia [1]. Quer o reconhecimento de agentes patogénicos por parte de células do sistema imunitário, quer as lesões que alguns tecidos sofrem, provocam uma reação inflamatória aguda que visa restabelecer a homeostasia. No entanto, caso esta resposta inflamatória de defesa falhe, a infeção pode progredir e chegar a ser letal. Por outro lado, alterações metabólicas em alguns tecidos podem originar processos inflamatórios crónicos que, por sua vez, podem estar na base de diversas doenças [2].

Nos últimos anos os inflamassomas assumiram-se como um novo paradigma em matéria de inflamação. Na presença de uma grande variedade de estímulos, exógenos e endógenos, ocorre a ligação de três estruturas proteicas, que se encontram naturalmente no interior das células, ocorrendo a formação de inflamassomas, complexos proteicos multiméricos que levam à produção de citocinas pró-inflamatórias [3].

Os mecanismos moleculares subjacentes à formação dos inflamassomas e ao seu funcionamento são uma das áreas da imunologia que tem sido alvo de intensa investigação. Dado que os inflamassomas assumem um papel preponderante ao nível da indução, regulação e manutenção de respostas imunológicas inatas e adaptativas, e como estão associados aos mecanismos fisiopatológicos de diversas patologias humanas, assumem-se, cada vez mais, como alvos terapêuticos bastante promissores [2]. Atualmente, sabe-se que os inflamassomas estão envolvidos em várias doenças imunológicas e inflamatórias, incluindo doenças neurodegenerativas, como a Esclerose Múltipla, Doença de Alzheimer (AD) e a Doença de Parkinson (PD), mas também em vários distúrbios metabólicos, nomeadamente a aterosclerose e a diabetes tipo 2 [4].

Com esta monografia pretende-se fazer uma abordagem completa sobre os inflamassomas, a sua estrutura, o seu funcionamento e os vários mecanismos envolvidos na sua ativação e controlo, para compreender de que forma é que estas plataformas interferem com o processo inflamatório associado a várias doenças. Serão depois abordadas algumas estratégias que beneficiam da ativação dos inflamassomas, como é o caso do desenvolvimento de novos adjuvantes para vacinas. Por último, mediante a relevância fisiopatológica destes complexos proteicos, irão ser abordadas também algumas estratégias terapêuticas que centralizam a sua ação nos inflamassomas e serão apresentados alguns fármacos seletivos e outros não seletivos.

2. Inflamassomas

2.1. Visão geral e funcionamento

Após a descoberta dos recetores transmembranares *toll-like* (TLRs), foram descritas duas novas classes de moléculas citoplasmáticas com capacidade de detetar estímulos provocados por microrganismos, os recetores *nod-like* (NLRs), que reconhecem por exemplo peptidoglicanos bacterianos, e os recetores *RIG-I-like*, que reconhecem RNA viral [1].

Os NLRs reconhecem uma grande variedade de estímulos intracelulares, isto é, padrões moleculares associados a sinais de alarme (DAMPs), como espécie reativas de oxigénio (ROS) e de estímulos extracelulares, ou seja, padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PAMPs). Desta forma, acabam por desempenhar um papel central em várias respostas inflamatórias e imunológicas inatas e adaptativas [2].

A maioria dos NLRs contem três domínios distintos:

- 1) um domínio rico em leucina (LRR) com um átomo de carbono terminal que funciona com sensor;
- 2) um domínio central de oligomerização de nucleótidos (NOD ou NACHT) que ativa o NLR e é responsável pela ligação dos três domínios;
- 3) um domínio efetor com um átomo de azoto terminal, podendo este ser um domínio de recrutamento de caspases (CARD), um domínio pirina (PYD) ou um domínio com uma repetição do inibidor de apoptose do Baculovírus (BIR) [3].

Existe um grande número de substâncias provenientes de infeções, lesões tecidulares e alterações metabólicas das células que podem desencadear o acoplamento e a formação de inflamassomas [1]. Deste modo, após o reconhecimento de um PAMP ou de um DAMP por parte de um NLR no citoplasma, forma-se um complexo proteico multimérico denominado de inflamassoma. Assim, um inflamassoma não é mais do que um NLR ativado ligado a um adaptador, que é uma proteína *speck-like* associada à apoptose (ASC) e a uma pro-caspase-1 [1]. O ASC contém um domínio pirina e um domínio CARD, permitindo assim que este consiga interagir com o domínio pirina dos NLRs e com o domínio CARD da pro-caspase-1, respetivamente (Fig.1) [3].

Esta interação entre as três proteínas que constituem os inflamassoma leva à clivagem da pro-caspase-1 com conseqüente formação da caspase-1, a sua forma ativa [1]. Subsequentemente, a caspase-1 é responsável pela conversão das formas inativas pro-IL-1 β e pro-IL-18 nas suas formas ativas IL-1 β e IL-18, duas citocinas pro-inflamatórias [5]. Estas proteínas são depois excretadas das células e podem iniciar ou exacerbar diversos processos inflamatórios.

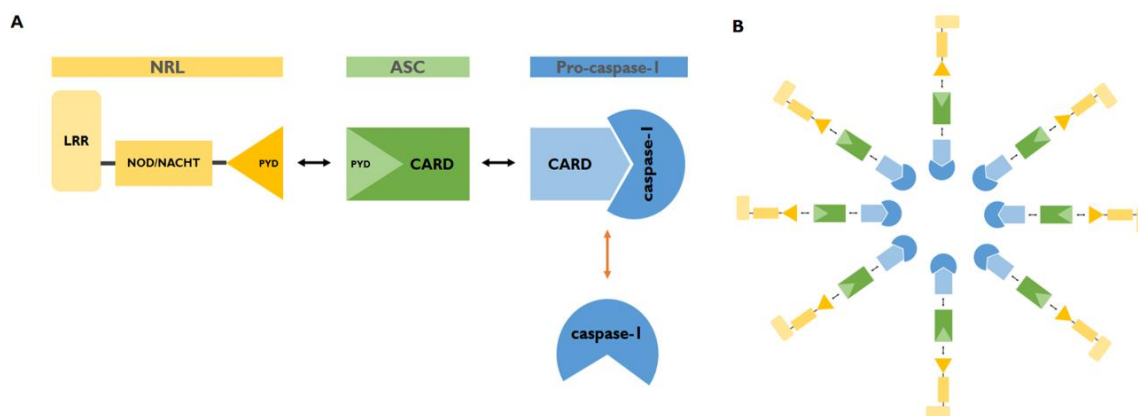


Fig. 1 – Estrutura geral de um inflamassoma. A – Ilustração da unidade estrutural de um inflamassoma, onde estão representadas as suas três proteínas, o NRL, o ASC e a pro-caspase-1, acopladas. B – Estrutura de um inflamassoma ativo, que corresponde a um conjunto de unidades estruturais representadas em A.

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória e um dos fatores catabólicos com mais efeitos ao nível da cartilagem e do osso. Esta citocina provoca apoptose das células β pancreáticas, podendo estar envolvida na origem da diabetes tipo 2, promove uma resposta inflamatória na túnica íntima dos vasos sanguíneos, estando por isso envolvida na aterogénese, e é também uma molécula fisiologicamente importante ao nível do hipotálamo, estando envolvida na geração dos processos da febre e da dor [6].

A IL-18 é uma citocina da família das IL-1 e ativa o mesmo tipo de recetores que a IL-1 β , tendo funções semelhantes às desta. É produzida por monócitos, macrófagos e células dendríticas (DCs) [7] e tem a capacidade de ativar a cinase de proteínas ativada por agentes mitogénicos (MAPK) e o fator de transcrição proteína ativadora 1 (AP-1), não tendo, no entanto, capacidade para ativar o fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- κ B) [8].

A ativação dos inflamassomas pode também provocar um processo rápido de morte celular denominado de piroptose [1].

2.2. Tipos de inflamassomas

Existem vários inflamassomas descritos até hoje (Fig.2), estando as suas denominações relacionadas com o tipo de recetor de reconhecimento de padrões (PRR) que integram. Desta forma, temos o NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP12, NLRC4, AIM2 e o PYRIN [2].

Os inflamassomas NLRP3, AIM2 e PYRIN necessitam obrigatoriamente do adaptador proteico ASC para interagirem com a pro-caspase-1 e para que ocorra o acoplamento das suas três unidades proteicas. No entanto, o NLRC4 e o NLRP1b conseguem interagir diretamente com a pro-caspase-1 sem o auxílio do adaptador ASC, utilizando

exclusivamente o seu domínio CARD. Nestes casos, o seu NLR tem um domínio CARD em vez de um domínio PYD.

Os inflamassomas que integram a proteína adaptadora ASC têm a capacidade de promover a maturação das pro-IL-1 β e pro-IL-18 nas suas formas ativas IL-1 β e IL-18 e de induzir a auto-proteólise da pro-caspase-1. Os inflamassomas que não contêm ASC desencadeiam um processo de piroptose dependente da caspase-1 [2].

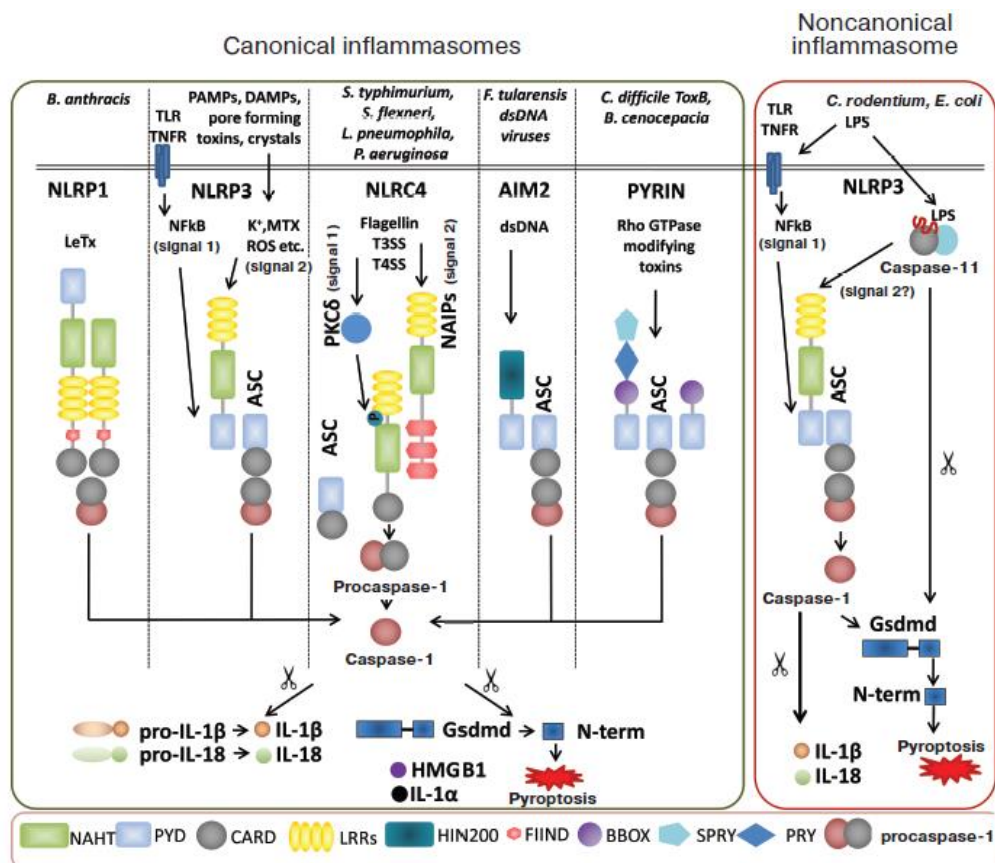


Fig. 2 – Estrutura dos principais inflamassomas que se encontram caracterizados atualmente (NLRP1, NLRP3, NLR4, AIM2 e PYRIN) e ilustração dos seus mecanismos de ativação [Retirado de 2].

2.2.1. Inflamassoma NLRP1

O primeiro inflamassoma a ser descrito foi o NLRP1b, que é responsável por reconhecer uma toxina letal excretada por *Bacillus anthracis* [2]. Além de ser ativado por esta toxina, sabe-se que a sua ativação também é despoletada por alguns constituintes de microrganismos, como lipopolissacarídeos (LPSs) e muramil dipéptido (MDP) [9].

Os mecanismos envolvidos na ativação deste inflamassoma ainda não são totalmente conhecidos no ser humano [2]. No entanto, evidências científicas recentes sustentam o envolvimento do NLRP1 na fisiopatologia de diversas doenças autoimunes da pele, como o vitiligo, lupus eritematoso sistémico (LES), psoríase e pênfigo vulgar [9].

O NLRP1 encontra-se expresso em queratinócitos e, além de ativar a caspase-1, consegue também ativar a caspase-5. Este inflamassoma, na presença de IL-17A, tem capacidade de potenciar a produção IL-1 β , através da amplificação da ativação do NLRP1 [9].

2.2.2. Inflamassoma NLRP3

O NLRP3, também denominado de Nalp3 e de proteína 3 com domínio pirina, é o inflamassoma mais bem estudado e caracterizado e a sua ativação está envolvida em diversos distúrbios metabólicos, como a gota, aterosclerose e diabetes tipo 2 [1]. Este inflamassoma encontra-se expresso em macrófagos, monócitos, DCs e em neutrófilos esplênicos [10].

Relativamente à sua ativação, existe uma grande variedade de estímulos que podem despoletar o acoplamento deste inflamassoma, com estruturas muito diferentes, sendo eles agentes patogénicos como a *Candida albicans*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, vírus influenza e LPSs, ou DAMPS, como cristais de colesterol, ácidos gordos, espécies reativas de oxigénio mitocondriais (mtROS), cristais de urato monossódico, efluxo de potássio e depósitos amiloides [1].

O acoplamento e consequente ativação do NLRP3 podem ocorrer através de um processo canónico com duas etapas ou através de um mecanismo não canónico. De acordo com o mecanismo de ativação canónico o primeiro passo (*priming step*) consiste na ativação dos TLRs pelos PAMPs, quer estes se encontrem na superfície celular ou em endossomas, ou através da ativação de recetores de citocinas pro-inflamatórias localizados na superfície das células. A ativação destes recetores promove a ativação e a translocação até ao núcleo de fatores de transcrição, como o NF- κ B, que induzem a transcrição de NLRP3 e pro-IL-1 β [3]. O segundo passo desta ativação tem um efeito direto no acoplamento do inflamassoma e é causado por um DAMP. A deteção de um efluxo de potássio, de uma alteração na homeostase do cálcio, de mtROS, a libertação de catepsina B de lisossomas ou, até mesmo, a ativação da proteína cinase R (PKR) podem levar assim à formação do inflamassoma (Fig.3) [3].

Quando estas duas etapas ocorrem, o NLRP3 catalisa a formação de caspase-1 a partir de pro-caspase-1, que por sua vez é a enzima responsável pela formação das IL-1 β e IL-18 e que induz a piroptose [3]. Contudo, quando ocorre o segundo passo sem se ter verificado a ocorrência do primeiro, a célula entra em apoptose, deixando de produzir efeitos inflamatórios [3].

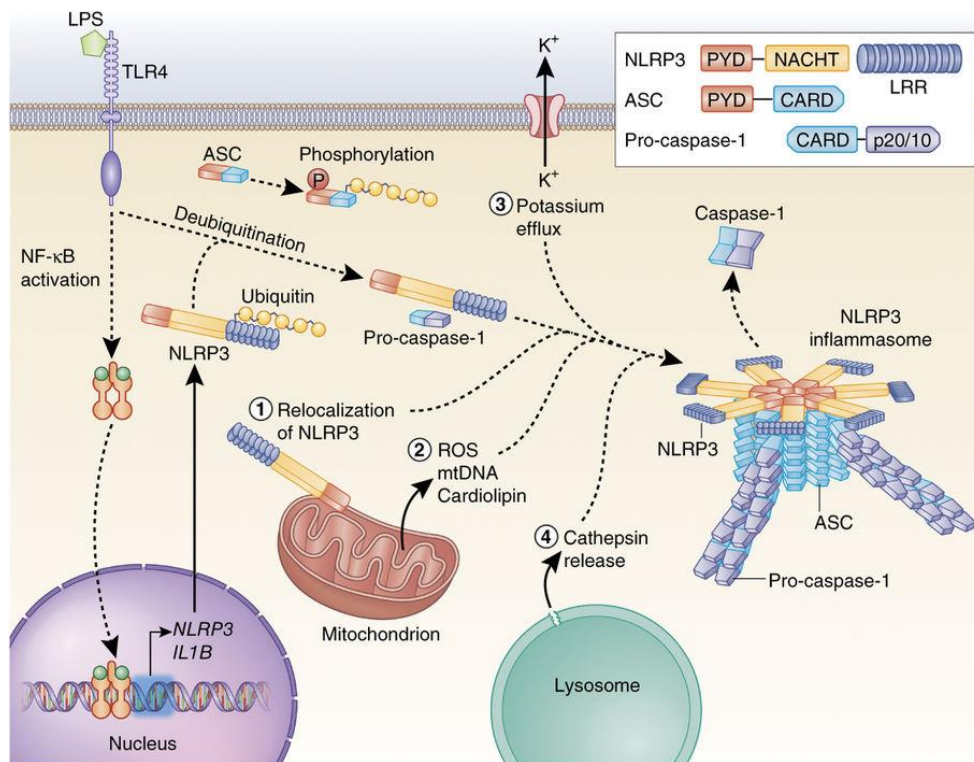


Fig. 3 – Ilustração do mecanismo canônico de ativação do inflamassoma NLRP3 [Retirado de 4].

Mais recentemente foi proposto um novo mecanismo para a ativação do NLRP3. Nesta nova abordagem não canônica, a ativação do NLR3 nos humanos é dependente da ação da caspase-4 ou da caspase-5, que detetam bactérias ou LPSs intracelulares [4]. No entanto, este mecanismo ainda não está totalmente esclarecido.

2.2.3. Inflamassoma NLRC4

O inflamassoma NLRC4 encontra-se expresso essencialmente em células epiteliais e mieloides e, ao contrário de outros, deteta um número reduzido de estímulos, particularmente flagelina, uma proteína bacteriana, e algumas constituintes de sistemas de secreção bacteriana do tipo III (TTSS) de certos agentes patogénicos como, por exemplo, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia thailandensis* e *Legionella pneumophila* [2].

Estudos recentes demonstraram que o NLRC4 não interage diretamente com os seus ligandos. Este inflamassoma forma complexos com várias proteínas inibidoras da apoptose neuronal (NAIPs), às quais se encontram ligados os seus

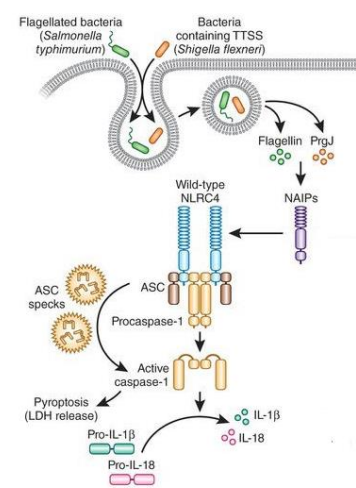


Fig. 4 – Ilustração da segunda fase do mecanismo de ativação do inflamassoma NLRC4 [Adaptado de 11].

ativadores [4]. Posto isto, o seu mecanismo de ativação consiste num processo bifásico. Primeiro ocorre a ativação de uma proteína cinase que fosforila o resíduo Ser533 do NLRC4 e, de seguida, as NAIP2 e NAIP5 reconhecem a molécula ativadora (estímulo) e ligam-se, despoletando o acoplamento do inflamassoma (Fig. 4) [2].

2.2.4. Inflamassomas AIM2 e PYRIN

O *absent in melanoma 2*, AIM2, é um inflamassoma com capacidade para ativar a caspase-1 e que se encontra associado a um recetor do tipo *absent in melanoma 2*, ao contrário dos apresentados anteriormente, que estão associados a NLRs [4].

O AIM2 reconhece essencialmente dsDNA do vírus vaccinia, de citomegalovírus, de *Francisella tularensis* e de *Listeria monocytogenes* [2]. No entanto, não reconhece uma sequência específica. A ativação do AIM2 é otimizada mediante o reconhecimento de uma dsDNA com pelo menos 80 pares de bases [4].

No que diz respeito ao inflamassoma PYRIN, esta estrutura intracelular reconhece alterações em GTPases Rho celulares provocadas por toxinas produzidas por *Clostridium difficile* e *Burkholderia cenocepacia* [2].

2.3. Mecanismos moleculares de ativação do inflamassoma NLRP3

Como descrito anteriormente, o processo de ativação do NLRP3 requer duas etapas. No entanto, é o segundo estímulo, provocado por um DAMP, que efetivamente promove a formação do inflamassoma, resultante do acoplamento dos seus três componentes.

Atualmente, consideram-se três mecanismos principais que funcionam como o segundo estímulo para a ativação do NLRP3, sendo eles a formação de ROS, um efluxo de iões potássio (K^+) e a rutura de lisossomas, com consequente libertação de catepsina B (Fig.5) [5].

As ROS, moléculas que naturalmente estão associadas ao normal funcionamento da mitocôndria, assumem um papel preponderante no que concerne ao desencadeamento da ativação do NLRP3, uma vez que muitos dos seus ativadores promovem a produção de ROS na mitocôndria.

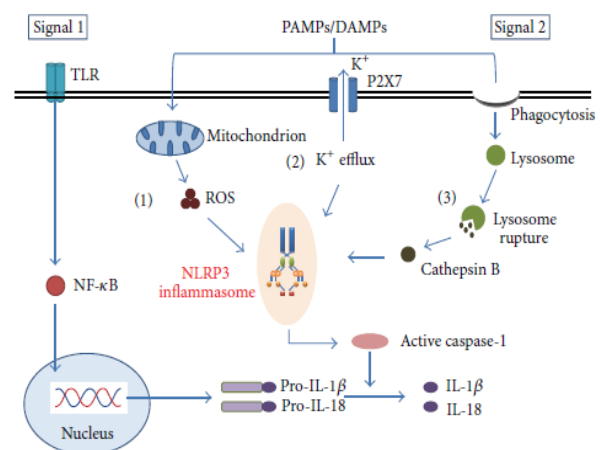


Fig. 5 – Modelo ilustrativo dos mecanismos moleculares de ativação do inflamassoma NLRP3 [Retirado de 5].

Estudos recentes demonstraram que a ligação da proteína de interação com a tioredoxina (TXNIP), uma proteína que regula a ativação do NLRP3 mediada por ROS, ao NLRP3 promove o recrutamento do ASC e da pro-caspase-1, levando ao acoplamento das três unidades proteicas que constituem este inflamassoma [5]. Por outro lado, verificou-se que caso a NADPH oxidase seja danificada, devido à presença de ROS, há ativação deste inflamassoma. Utilizando um tipo de antioxidante específico para a mitocôndria, o Mito-TEMPO, no sentido de neutralizar as *mtROS*, verificou-se uma inibição da ativação do NLRP3 e, conseqüentemente, da secreção de IL-1 β e IL-18 [5]. Ainda assim, a existência de ROS não parece ser um critério obrigatório para a formação e ativação do NLRP3, na medida em que há estudos que demonstraram as *mtROS* induzem a transcrição de NLRP3 e pro-IL-1 β , mas não o acoplamento e ativação do NLRP3 [5].

No que diz respeito à diminuição da concentração intracelular de iões K⁺, tem-se investigado o mecanismo subjacente à origem deste evento celular. Por exemplo, uma elevada concentração extracelular de ATP pode provocar o efluxo de K⁺, através da ativação do recetor purinérgico P2X7 (P2X7). Num estudo recente utilizou-se a glibenclamida, um inibidor dos canais de K⁺, e observou-se uma inibição da formação de NLRP3 mesmo na presença de várias moléculas ativadoras deste inflamassoma, uma prova de que o efluxo de potássio é um DAMP que contribui para a formação deste inflamassoma [5].

Quando ocorre destruição de lisossomas ou destabilização das suas membranas, ocorre libertação do seu conteúdo, nomeadamente catepsina B. Estudos recentes demonstram que a libertação de catepsina B para o citoplasma está associada à formação de NLRP3. A rutura dos lisossomas pode ser provocada por várias substâncias cristalinas, como a sílica, sais de alumínio e asbestos, ou ocorrer devido à destabilização do fagolisossoma após a fagocitose, provocando, dessa forma, a ativação do NLRP3 [5].

Um estudo demonstrou que algumas partículas, como os lipossomas, induziam a produção de ROS, isto é, stress oxidativo, por um mecanismo dependente do influxo de iões Ca²⁺, através do recetor de potencial transitório da melastatina 2 (TRPM2). Este recetor, que se encontra expresso em DCs, monócitos, macrófagos, linfócitos e células polimorfonucleares (PMNs), consiste num canal iónico não seletivo. Este estudo conclui que o influxo de cálcio, via TRPM2, induz a libertação de IL-1 β e que a deficiência do recetor inibia a ativação da caspase-1 e, por sua vez, a indução da inflamação dependente da ativação do NLRP3 [12].

O recetor X do pregnano (PXR) pertence a uma superfamília de recetores nucleares e é responsável pela desintoxicação de xenobióticos das células endoteliais. Além da sua função de revestimento dos vasos sanguíneos, tem um papel bastante importante nas

respostas imunitárias inatas e adaptativas. O endotélio, dado que corresponde à camada celular mais interna dos vasos sanguíneos, acaba por ser o primeiro a contactar com xenobióticos veiculados na corrente sanguínea e com outros agentes patogénicos/agressores para o organismo [13].

Recentemente, um estudo com células endoteliais de veias de cordão umbilical humano (HUVECs), concluiu que o PXR ativava o NLRP3 nas células endoteliais, através do aumento dos estímulos promotores da ativação deste inflamassoma. Desta forma, desencadeia-se uma resposta inflamatória e imunológica, no sentido de ativar processos de desintoxicação e de *clearance* dos agentes xenobióticos [13].

A ativação do NLRP3 também pode ser desencadeada por várias viroporinas de vírus de RNA, como os vírus Influenza, o vírus da Encefalomiocardite (EMCV), o Rinovírus ou o Coronavírus [14]. Após a infeção das células hospedeiras, os vírus utilizam estratégias que lhes permitem replicarem-se. As viroporinas virais podem formar poros ou canais iónicos que aumentam a permeabilidade das membranas celulares e mitocondriais das células infetadas, gerando uma desregulação iónica intracelular, que tem como resultado a ativação do NLRP3 [15]. Por exemplo, a viroporina 2B do EMCV tem um papel importante ao nível da ativação do NLRP3, bem como a viroporina p7, do vírus da Hepatite C (HCV) [15].

Relativamente aos mecanismos de ativação do NLRP3 por ação de vírus, o processo mais estudado é o da infeção pelo vírus Influenza. Numa primeira etapa ocorre o reconhecimento do RNA viral pelo TLR7 ou TLR8, promovendo o aumento da produção de pro-IL-1 β no citoplasma. O segundo sinal corresponde à ação da proteína viral M2, com formação de um canal iónico seletivo que gera um fluxo iónico das porções *trans* do aparelho de Golgi para o citoplasma, desencadeando a produção de ROS. Desta forma, ocorre o acoplamento e ativação do NLRP3 [3].

Várias espécies de bactérias, fungos e parasitas têm a capacidade de ativar o NLRP3 e assim provocar uma reação inflamatória, através de produção de citocinas pró-inflamatórias [3].

Um estudo recente demonstrou que os β -glucanos das paredes celulares dos fungos ativam a caspase-8, através de um mecanismo dependente da Tec tirosina cinase, num processo isento de fagocitose. Observou-se, também, que as células deficientes em Tec libertam níveis mais reduzidos de citocinas pró-inflamatórias, mediante um mecanismo não canónico de ativação do inflamassoma associado à caspase-8. Apesar deste mecanismo não estar relacionado com a ativação do NLRP3, este estudo concluiu que a Tec cinase é um potencial alvo terapêutico para inibição em situações de infeções fúngicas [12].

Além dos mecanismos referidos previamente, existem muitos outros que se mantêm incógnitos ou por clarificar. Torna-se extremamente relevante perceber de que forma é que cada um dos ativadores promove a formação e ativação do NLRP3 e quais os mecanismos moleculares subjacentes a essa ativação, para se elucidar o potencial envolvimento dos inflamassomas na génese de doenças com um *background* inflamatório. Só assim será possível desenvolver estratégias terapêuticas que atuem nestes complexos proteicos.

2.4. Modulação do funcionamento dos inflamassomas por fatores de virulência

Os inflamassomas têm um papel preponderante na geração de processos inflamatórios e na ativação de respostas imunológicas provocadas por infeções bacterianas, pelo que influenciam diretamente a sua disseminação e replicação no organismo humano. Uma falha ao nível da ativação destes mecanismos de defesa pode significar a perpetuação de uma infeção. No entanto, as próprias bactérias também desenvolveram mecanismos que lhes permitem resistir e subverter a função dos inflamassomas, evitando que estes se formem e se produzam citocinas pró-inflamatórias (Anexo 1) [2].

As bactérias das espécies *Yersinia spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Chlamydia trachomatis*, *Francisella tularensis*, *Shigella flexneri*, *Legionella pneumophila* e *Coxiella burnetti* têm a capacidade de produzir e segregar uma panóplia de fatores de virulência que lhes permitem escapar aos mecanismos de defesa do organismo humano e, deste modo, perpetuar a sua replicação. Estes fatores de virulência consistem, essencialmente, em mecanismos de excreção e libertação de toxinas que formam poros nas células hospedeiras [2].

Na Tabela I encontram-se enumerados alguns exemplos de fatores de virulência de algumas bactérias, bem como o mecanismo pelo qual cada um deles interfere com a ativação de inflamassomas.

Os vírus também possuem mecanismos que lhes permitem escapar ao controlo exercido pelo sistema imunitário, sendo que muitos desses mecanismos estão relacionados com a modulação da ativação dos inflamassomas. Especificamente, vírus que codificam inibidores das caspases têm sofrido um processo de seleção natural, uma vez que conseguem inibir processos inflamatórios e apresentam, por isso, melhor replicação viral [2]. Conhecem-se, atualmente, quatro tipos principais de moléculas virais capazes de inibir as caspases, sendo eles as serpinas, proteínas inibidoras da apoptose, proteínas da família da p53 e proteínas inibidoras FLICE [2].

Tabela 1 – Mecanismos de ação pelos quais os fatores de virulência de algumas bactérias conseguem inibir a formação de inflamassomas [Retirado de 2].

ESPÉCIE BACTERIANA	FATOR DE VIRULENCIA	MECANISMO DE AÇÃO
<i>Yersinia enterocolitica</i>	YopE (TTSS)	Inibe a ativação da caspase-1 via TTSS e a secreção de IL-1 β . Contribui para a hidrólise das GTPases Rho celulares, destruição de filamentos de actina e inibição do acoplamento dos inflamassomas.
<i>Yersinia pestis</i>	YopM (TTSS)	Liga-se diretamente à caspase-1, inibindo a sua atividade. Dificulta o acoplamento dos inflamassoma e interfere com a piroptose.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Exoenzima S	Ao ativar a ADP-ribosiltransferase, dificulta a produção de IL-1 β dependente da ação dos inflamassomas.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriolisina (LLO)	A LLO permite que as bactérias escapem à fagocitose e evitem os PRRs citosólicos através de uma rápida migração nas células hospedeiras dentro de vacúolos.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Serotipo 1 LST306	Devido à produção de uma toxina não-hemolítica, ativa a caspase-1 de forma deficiente, induzindo uma fraca resposta inflamatória.

Relativamente ao vírus Influenza A, sabe-se que a sua proteína M2, um canal iónico seletivo, ativa o inflamassoma NLRP3 em várias células, nomeadamente macrófagos e DCs. No entanto, um estudo recente demonstrou que a proteína não estrutural 1 (NS1) inibe a secreção de IL-1 β , num processo que depende da ativação do NLRP3. O que este estudo demonstra é que a proteína NS1 sequestra o RNA viral ou liga-se ao recetor RIG-I nas células infetadas e dessa forma inibe a ativação do NLRP3 e, conseqüentemente, a produção de IL-1 β [14].

No Anexo 2 apresenta-se uma tabela com alguns exemplos de vírus e dos seus fatores de virulência, bem como o mecanismo pelo qual cada um deles inibe a ativação de inflamassomas.

2.5. Mecanismos de regulação da atividade do NLRP3

Os mecanismos de regulação do NLRP3 são essenciais para que não ocorram situações de exacerbação da sua atividade, uma vez que estas podem estar associadas a algumas síndromes auto-inflamatórias.

A autofagia é um mecanismo celular responsável pelo *turnover* proteico, bem como pela degradação e eliminação de organelos celulares danificados e agentes patogénicos intracelulares [1].

A autofagia regula negativamente a ativação do NLRP3 e os processos inflamatórios dependentes da sua ativação [1]. Por um lado, há estudos que demonstram que os componentes dos inflamassomas e a pro-IL-1 β são degradados em autofagossomas, através de um mecanismo que envolve o recetor autofágico p62 [1]. Por outro lado, outros estudos constataram que através de processos de autofagia dá-se a eliminação de mitocôndrias danificadas, sendo prevenida a libertação de *mtROS* e *mtDNA*, ou seja, DAMPs, que iriam levar à ativação do NLRP3 no citoplasma [1].

Numa primeira instância, e na ausência de estímulos externos ou internos, a autofagia atua no sentido de remover pro-IL-1 β e componentes do inflamassoma, de forma a manter a homeostasia celular [1]. No entanto, perante um estímulo, o NLRP3 é ativado e a autofagia atua primeiramente no sentido de promover uma resposta inflamatória e prevenir a morte celular através da piroptose. Mais tarde, a autofagia atua como um mecanismo de controlo da atividade do inflamassoma por *feedback* negativo, de forma a prevenir a sua exacerbação. Assim, torna-se evidente que é crucial uma boa sincronização entre a ativação do NLRP3 e os processos de autofagia, de forma a evitar processos inflamatórios crónicos [1].

Uma elevada concentração intracelular de Ca²⁺ promove a produção de *mtROS*, que danificam as mitocôndrias e promovem a produção de mais *mtROS*, um forte sinal para a ativação do NLRP3. As *mtROS* também podem provocar a oxidação do *mtDNA*, que se liberta das mitocôndrias danificadas e ativa o NLRP3. É por este motivo que, além da autofagia, as mitocôndrias também têm um papel fundamental no controlo da ativação e regulação dos inflamassomas [17]. Desta forma, através da manipulação de processos como a autofagia e a mitofagia, isto é, a remoção de mitocôndrias danificadas através da autofagia, poderá ser possível interferir e modular a ativação do NLRP3 (Fig.6) [17]. Estes mecanismos constituem, assim, alvos terapêuticos promissores passíveis de modulação farmacológica por moléculas inibidoras do NLRP3 e com potencial terapêutico nalgumas doenças imunitárias e auto-inflamatórias [17].

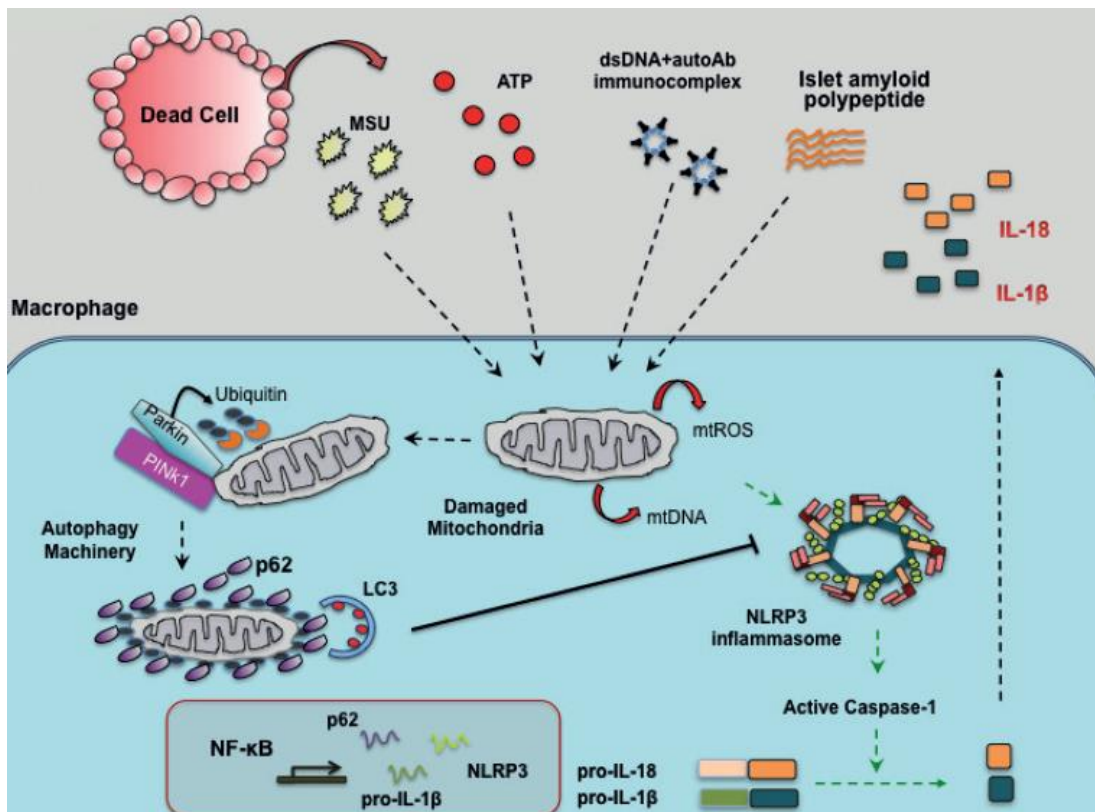


Fig. 6 – Mecanismos de regulação da atividade do NLRP3 pelo estado das mitocôndrias e pelos processos de autofagia e mitofagia [Retirado de 17].

3.Relevância fisiopatológica dos inflamassomas

3.1. Doenças do Sistema Nervoso Central

Os traumatismos cranianos induzem o acoplamento do NLRP3 e a ativação da caspase-1, levando à formação de IL-1 β e IL-18 [5].

Um estudo recente demonstrou que o NLRP1 também é um importante agente mediador da resposta inflamatória provocada por um traumatismo craniano. Este estudo demonstrou que os doentes com traumatismos cranianos com níveis mais elevados do NLRP1 no líquido cefalorraquidiano apresentaram menos melhorias, em comparação com os que tinham níveis mais baixos deste inflamassoma [5]. Desta forma, o NLRP1 e o NLRP3 estão na base da inflamação provocada por um traumatismo craniano e assumem-se como promissores alvos terapêuticos nestas situações patológicas [5].

Num quadro clínico de tumor cerebral, existe uma série de moléculas que funcionam como promotores do tumor, induzindo a ativação do NLRP3 e, por isso, um processo inflamatório crónico associado ao cancro. Além disto, o NLRP3 também tem a capacidade de suprimir a função das células NK relativamente ao controlo da carcinogénese e controlo das metástases. Contudo, ao promover o recrutamento de neutrófilos, assume um papel

importantíssimo no controlo do tumor, sendo um alvo terapêutico a ter em atenção em doentes com cancro [5].

A AD, uma doença neurodegenerativa, é a causa de demência mais prevalente atualmente. A acumulação extracelular de placas β -amilóides pode ativar o NLRP3 e levar à produção de citocinas IL-1 β e IL-18 e, desta forma, acionar um conjunto de mecanismos que podem levar à destruição do tecido nervoso, o que se reflete na perda de memória [5]. Neste sentido, a inibição da ativação do NLRP3 é indicada como uma estratégia que poderá proteger a diminuição da memória e diminuir a deposição de placas β -amilóides [5].

A PD é outra doença neurodegenerativa marcada pela perda progressiva de neurónios dopaminérgicos na substância *nigra* e pela acumulação de corpos de Lewy nos neurónios. Os corpos de Lewy são compostos por uma proteína pré-sináptica denominada de α -sinucleína que é responsável pela ativação do NLRP3 e pela fisiopatologia da PD. Da mesma forma, a inibição da ativação do NLRP3 é sugerida como uma estratégia que poderá ser útil na PD [5].

3.2. Hipertensão arterial

A hipertensão arterial, que é tida como um fator de risco para inúmeras doenças cardiovasculares, está associada a uma inflamação crónica nalguns tecidos e órgãos críticos para o controlo da pressão sanguínea, como é o caso dos rins e dos vasos sanguíneos (Fig.7) [18]. A inflamação renal provoca danos glomerulares e alterações ao nível da excreção de Na⁺, enquanto a inflamação ao nível dos vasos sanguíneos pode contribuir para que surjam danos e alterações nas funções do endotélio [18].

Recentemente demonstrou-se que a IL-1 β e a IL-18, além de serem produzidas por monócitos e macrófagos, também podem ser produzidas pelo endotélio e pelo epitélio do túbulo renal, quando expostos a determinados estímulos [18].

Atualmente sabe-se que os níveis de citocinas IL-1 β e IL-18 se encontram elevados durante quadros clínicos de hipertensão [18]. No entanto, não foi ainda possível inferir se estes níveis elevados de IL-1 β e IL-18 são causa ou consequência da hipertensão. Além disso, ainda não foi possível concluir que a produção de citocinas pró-inflamatórias é originada pela

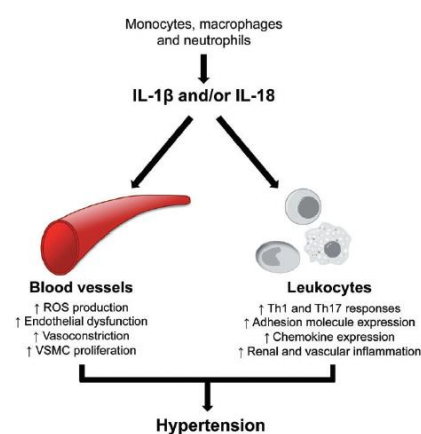


Fig. 7 – Efeitos da IL-1 β e da IL-18 ao nível dos vasos sanguíneos e dos leucócitos [Retirado de 18].

ativação do NLRP3 e desconhecem-se os potenciais estímulos dessa ativação [18]. Posto isto, esta é uma área que ainda permanece pouco estudada, mas que urge ser investigada, dado o impacto que a hipertensão arterial detém na vida das pessoas.

3.3. Aterosclerose

A inflamação crónica tem um papel fundamental ao nível a iniciação e progressão de doenças metabólicas, como é o caso da aterosclerose. Esta doença representa 70% dos casos de morbilidade em doentes com diabetes tipo 2 [4] e trata-se de uma doença crónica caracterizada pelo estreitamento progressivo dos vasos arteriais, devido a alterações do metabolismo lipídico e à acumulação de colesterol e células sanguíneas na parede das artérias, que dificultam o fluxo sanguíneo e a oxigenação dos tecidos [4].

Constatou-se, através de estudos feitos em ratos, que a IL-18 produzida a partir da ativação de um inflamassoma pode ter um papel central na iniciação e progressão deste distúrbio. Além disso, sabe-se também que as placas ateroscleróticas humanas apresentam elevadas concentrações de IL-18 e recetores de IL-18 [4].

Utilizando cristais de colesterol, num estudo *in vitro* com células humanas, verificou-se que estes ativam o NLRP3. *In vivo*, verificou-se que uma injeção de cristais de colesterol provocou uma inflamação aguda, sendo esta atenuada em células deficientes em componentes do inflamassoma NLRP3 [4].

3.4. Diabetes tipo 2

A diabetes tipo 2 é um dos maiores problemas de saúde a nível mundial. Os doentes apresentam normalmente níveis elevados de fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas e adipocinas [4]. Particularmente a IL-1 β tem sido relacionada com a fisiopatologia da diabetes, uma vez que promove resistência à insulina e causa disfunção e apoptose das células β pancreáticas. Deste modo, vários estudos foram desenvolvidos com o intuito de comprovar a relação entre a exacerbação do funcionamento do NLRP3 e a inflamação crónica e resistência à insulina, inerentes à diabetes tipo 2 [4].

Outros estudos demonstraram que níveis elevados de glucose sanguínea induzem a expressão de IL-1 β nas células β do pâncreas, muito provavelmente através da ativação do NLRP3 mediada pela TXNIP. Desta forma, pode afirmar-se que a concentração de glucose regula a expressão de TXNIP que, devido ao alto stress oxidativo, sofre alterações estruturais provocadas por ROS. Consequentemente, a TXNIP dissocia-se da tiorredoxina e associa-se ao NLRP3, promovendo a sua ativação [4]. No entanto, estes resultados não se mostraram reprodutíveis quando investigados por outros investigadores.

3.5. Cancro

A inflamação crónica pode ser vista como um modulador do processo de carcinogénese devido à produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, que levam à formação de um microambiente inflamatório, uma das características associadas à carcinogénese [19].

Tem sido reportado, em vários estudos, que a inflamação crónica promove a carcinogénese através da resistência à inibição do crescimento celular, formação de vasos sanguíneos, promoção do processo de metastização e do escape à apoptose. Neste sentido, dados atuais demonstram que aproximadamente 20% dos cancros humanos estão relacionados com quadros de inflamações crónicas [19].

Os inflamassomas e, mais propriamente o NLRP3, têm um papel duplo e contraditório em relação ao cancro, podendo apresentar um papel anti- ou pró-tumoral [19].

O NLRP3 provoca a secreção de IL-18, uma citocina que promove a homeostasia intestinal e, neste sentido, pode ter um papel protetor em situações de cancro colorretal. Além disso, a IL-18 inibe a expressão de IL-22, uma citocina responsável pela indução da proliferação celular. Por outro lado, a IL-18 é essencial no processo de maturação das células NK hepáticas, que controlam a formação de metástases no cancro colorretal [19].

Em oposição ao que foi referido anteriormente, a IL-1 β libertada após ativação do NLRP3 inibe a atividade das células NK e células T, promovendo a formação de metástases pulmonares e mesoteliomas, respetivamente. Esta citocina também tem uma ação sobre as células supressoras derivadas da linhagem branca (MDSCs), estimulando a sua migração para locais de maior predisposição tumoral, podendo provocar cancro gástrico [19].

3.6. Mesotelioma Maligno

O mesotelioma maligno (MM) é um tipo de neoplasia das células mesoteliais causada por asbestos, altamente resistente à radio e quimioterapia, para o qual ainda não foi encontrado nenhuma terapêutica eficaz [20]. Além de outros mecanismos, um defeito ao nível da apoptose parece ser um dos fatores que contribui para a resistência desta neoplasia aos fármacos [20].

Um estudo realizado recentemente demonstrou que as células tumorais do MM apresentam baixos níveis de alguns componentes do NLRP3, de caspase-1 e reduzida ativação deste inflamassoma, quando comparadas com células mesoteliais humanas saudáveis [20]. Além disso demonstrou-se que fármacos como a cisplatina e doxorubicina aumentavam os níveis de NLRP3 em células de MM, bem como os níveis de citocinas pró-

inflamatórias, nomeadamente IL-1 β e IL-18 [20]. Este estudo foi o primeiro a concluir que alguns fármacos usados em quimioterapia ativam o NLRP3 nas células de MM, resultando no aumento da atividade da caspase-1 e no aumento da morte celular através da piroptose, verificando-se um efeito anti-tumoral. No entanto, a ativação do NLRP3 está também associada a um aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias que, neste caso, têm um papel contrário e promovem o crescimento tumoral [20]. Deste modo, foi proposta a associação de um fármaco anti-tumoral, a cisplatina, com um antagonista dos recetores de interleucinas da família I (IL-1R), como é o caso da anakinra, de forma a obterem-se melhores resultados terapêuticos anti-tumorais. Estes resultados são apresentados no Anexo 3 [20].

3.7. Deficiência de Mevalonato Cinase

A deficiência de mevalonato cinase (MKD) é uma doença rara autossômica recessiva que afeta a biossíntese de colesterol, sendo causada por mutações genéticas no gene que codifica a enzima mevalonato cinase (MK), fazendo com que esta tenha menor atividade do que o normal [21].

Um estudo reporta que o NLRP3 está envolvido na fisiopatologia desta doença, através do aumento da produção de IL-1 β e da piroptose, originando um processo inflamatório. Um dos principais sintomas destes doentes é apresentarem febres periódicas altas, na ordem dos 40°C, o que por sua vez reduz ainda mais a atividade da MK, diminuída *per si* nestes doentes [21]. As elevadas temperaturas têm, também, uma ação sob o funcionamento do NLRP3 e sob a ação da IL-1 β , diminuindo as suas atividades. Assim, a temperatura elevada acaba por ser um sinal da fase aguda da doença, mas também uma condição para a resolução da mesma [21].

3.8. Lesões intestinais provocadas por AINEs

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) têm como efeito secundário potenciais lesões intestinais, nomeadamente a formação de úlceras (Fig. 8). Devido ao efeito dos AINEs, verifica-se uma diminuição das prostaglandinas e disfunção mitocondrial nas células da mucosa intestinal, diminuindo a sua função de barreira. Deste modo, os LPs das bactérias gram-negativas do lúmen intestinal e as proteínas de alta mobilidade com domínio *box 1* (HMGB1), com origem no epitélio danificado, são reconhecidos por recetores TLR4 dos macrófagos. Este reconhecimento resulta na ativação do NLRP3 e leva à produção das citocinas IL-1 β e TNF- α e de quimiocinas, que por sua vez desencadeiam o recrutamento e infiltração de neutrófilos nas camadas mucosa e submucosa do intestino delgado, causando

vários danos através da produção e libertação de moléculas citotóxicas, como é o caso de ROS e elastase [22].

Este mecanismo é só um exemplo de como o inflamassoma NLRP3 está envolvido em vários tipos de processos subjacentes a processos inflamatórios. Uma forma de evitar este tipo de efeitos secundários dos AINEs pode passar pela modulação da atividade do NLRP3.

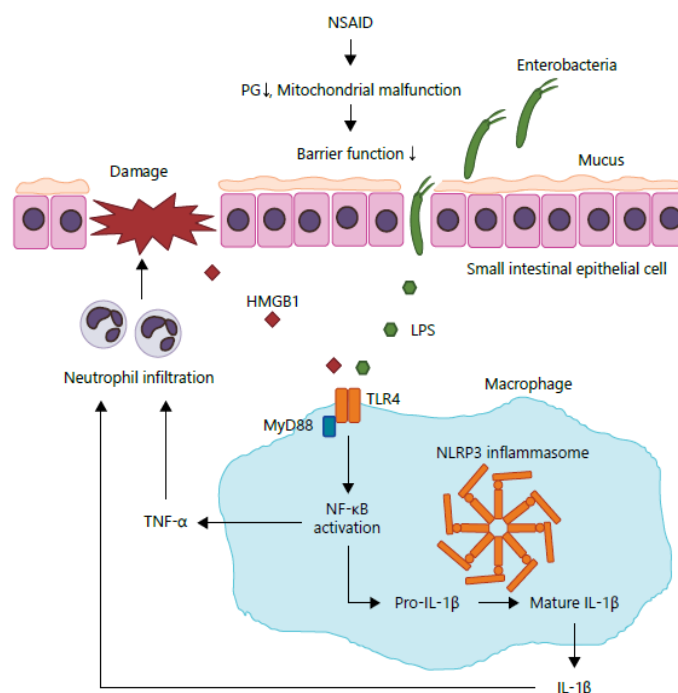


Fig. 8 – Mecanismo de formação de danos intestinais provocados por AINEs [Retirado de 22].

4. Adjuvantes de vacinas – ação nos inflamassomas

Embora não sejam eles próprios antígenos, os adjuvantes utilizados em vacinas são substâncias que têm a capacidade de ativar certos eventos do sistema imunitário inato e, dessa forma, aumentar a sua eficácia e potenciar o seu efeito.

A utilização de partículas como adjuvantes de vacinas foi recentemente descrita e está relacionada com a ativação do NLRP3 e com o reconhecimento de partículas por parte de TLRs. A inclusão de antígenos em partículas e a sua subsequente deteção por DCs permite que ocorra um processo de reconhecimento imunológico celular específico e mais profícuo para esse antígeno. Partículas com tamanho inferior a 1 µm e com revestimento anfipático conseguem direcionar os antígenos para as DCs e ativá-las, promovendo a estimulação do sistema imunitário humoral e celular [3].

Os adjuvantes que contêm alumínio melhoram a ativação da caspase-1 e a secreção de IL-1 β e IL-18 em DCs, na presença de agonistas de TLRs. O alumínio, através da destruição de lisossomas, formação de ROS ou mesmo através da indução de um efluxo de potássio, promove a ativação do inflamassoma NLRP3 [3]. Além deste metal, existem outras partículas que têm a capacidade de ativar o NLRP3 e promoverem a produção de IL-1 β em DCs, na presença de um agonista dos TLRs, como é o caso do quitosano, micropartículas (de poliestireno e de poli (ácido lático-co-ácido glicólico), também conhecido por PLGA) e nanopartículas [3]. Tendo em conta estes estudos, concluiu-se que a libertação de DAMPs no local da injeção pode ter um efeito sinérgico na ativação dos inflamassomas e na indução da resposta inflamatória [3].

As vacinas que utilizam *polymeric multilayer capsules* (PMLCs) induzem uma resposta imunitária com efeito protetor em situações oncológicas e infeções virais. Estas cápsulas permitem que a libertação dos antígenos seja feita de forma mais eficaz às células apresentadoras de antígenos. As PMLCs têm a capacidade de ativar o NLRP3 e de desencadear a libertação IL-1 β [3].

As partículas poliméricas têm, igualmente, sido investigadas como plataformas para a libertação de fármacos, vacinas e agentes de contraste, sendo cada vez mais utilizadas para diversos fins clínicos [23]. Estas micropartículas, que ativam os inflamassomas e desencadeiam a libertação de citocinas pró-inflamatórias, interagem com as células de maneira diferencial, sendo a sua forma/superfície uma das características que mais influencia este processo [23].

Um estudo recente demonstrou que a ativação do NLRP3 é um passo essencial para o recrutamento de neutrófilos induzido por partículas poliméricas. No entanto, os autores verificaram que partículas com uma superfície irregular induzem uma estimulação mais frutífera, quando comparada com o efeito provocado por partículas com a superfície lisa [23]. Por outro lado, também se observou que as partículas com superfície irregular promoviam maior formação de IL-1 β dependente da ativação do NLRP3 [23].

O ISCOMATRIX (IMX) é um adjuvante utilizado em vacinas que induz a ativação de células T CD8⁺ citotóxicas, sendo essencial para a eficácia terapêutica de vacinas antivirais e anticancerígenas. O IMX apresenta uma estrutura semelhante a uma “jaula”, com um diâmetro de aproximadamente 40 nm, e é constituído por fosfolípidos, saponinas e colesterol (Fig.9) [24].

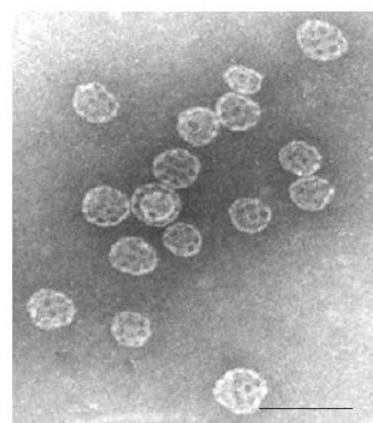


Fig. 9 – Estrutura tipo “jaula” do ISCOMATRIX [Retirada de 25].

Tal como outros adjuvantes, o IMX também tem a capacidade de ativar o NLRP3 nas células apresentadoras de antígenos, levando à produção de IL-1 β e IL-18 [24].

Estes estudos enfatizam a relevância da ativação dos inflamassomas, nomeadamente do NLRP3, no efeito adjuvante pretendido e têm permitido criar adjuvantes cada vez mais eficazes no auxílio da estimulação e ativação de respostas imunitárias. Este envolvimento dos inflamassomas acaba por ser um exemplo de que a sua ativação propositada, sem nenhuma patologia subjacente, apresenta um efeito benéfico e útil no campo da vacinação.

5. Estratégias Terapêuticas

Dada a versatilidade e o grande envolvimento dos inflamassomas, especialmente do NLRP3, em vários processos fisiopatológicos de diversas doenças, originadas por agentes patogénicos ou por desequilíbrios metabólicos, estes complexos proteicos representam, cada vez mais, alvos terapêuticos atrativos para modular os processos inflamatórios subjacentes a várias patologias. No entanto, as alternativas disponíveis atualmente no mercado não são seletivas e não atuam especificamente nos inflamassomas, mas antes a jusante da sua ativação, mais especificamente ao nível dos seus efeitos.

5.1. Antagonistas da IL-1 β

Para o tratamento de várias doenças relacionadas com o inflamassoma NLRP3, tem-se apostado na investigação de fármacos que antagonizem a ação da IL-1 β , no sentido de neutralizar os efeitos da ativação deste inflamassoma. Deste modo, existem disponíveis vários compostos não seletivos inibidores do NLRP3, nomeadamente agentes biológicos que atuam ao nível dos recetores IL-1R [3].

O anakinra (Kinerest[®]; Sobi, Inc.) é uma molécula recombinante que atua como antagonista dos recetores IL-1R [3]. Este fármaco foi aprovado em 2011 para o tratamento da artrite reumatoide, encontrando-se já aprovado na Europa, para o tratamento de síndromes periódicas associadas à criopirina (CAPS) e, nos Estados Unidos da América, para o tratamento de síndromes articulares e cutâneas crónicas infantis [8].

O canakinumab (Ilaris[®]; Novartis) é um anticorpo monoclonal anti-IL-1 β com a capacidade de neutralizar a IL-1 β . Este anticorpo encontra-se aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), desde 2009, para o tratamento de CAPS [8].

O ritoncept (Arcalyst[®]; Regeneron) é um agente biológico que funciona como um “falso” recetor das interleucinas IL-1 e que tem tido resultados positivos para o tratamento de CAPS. Além disto, tem-se estudado a sua ação ao nível de outras doenças onde a IL-1 β

está envolvida [3]. Ainda assim, encontra-se apenas aprovado pela FDA para o tratamento de alguns tipos de CAPS [8].

O gevakizumab é um anticorpo recombinante anti-IL-1 β que modula a bioatividade da interleucina IL-1 β , através da diminuição da sua afinidade para o complexo de sinalização IL-1RI:IL-1RAcP. No entanto, o desenvolvimento clínico deste anticorpo para o tratamento da uveíte foi interrompido em 2016, após a fase 3 dos ensaios clínicos, uma vez que os resultados obtidos não corresponderam aos *endpoints* definidos inicialmente no estudo [8].

O P2D7KK é um agente neutralizador da IL-1 β com ação demonstrada *in vitro*. Trata-se de um anticorpo monoclonal com um mecanismo de ação igual ao do canakinumab, embora tenha uma potência onze vezes superior. Este anticorpo ainda não foi testado em humanos, mas os resultados em modelos animais mostraram-se bastante promissores [8].

5.2. Antagonistas da IL-18

O anticorpo GSK-1070806 (*GlaxoSmithKline*) é o único fármaco, estudado até ao momento, que atua diretamente na IL-18. Trata-se de um anticorpo que tem capacidade de neutralizar a IL-18. No entanto, e apesar da neutralização da IL-18 apresentar efeitos positivos ao nível da redução da severidade em modelos experimentais de colite, este fármaco biológico não provocou melhorias no controlo dos níveis de glicémia num estudo realizado em humanos com diabetes tipo 2 [8]. Ainda assim, não deixa de ser um fármaco com interesse terapêutico.

5.3. Inibidores do NLRP3

Apesar de todas as estratégias terapêuticas abordadas anteriormente e de toda a investigação realizada na última década, o objetivo primordial consiste em identificar fármacos que atuem diretamente nos inflamassomas e que sejam seletivos para estes complexos proteicos intracelulares. Assim, conhecem-se já algumas moléculas com atividade inibitória seletiva sobre o NLRP3, nomeadamente a molécula MCC950, o β -hidroxibutirato (BHB) e a glibenclamida [8].

A MCC950 (Fig. 10) é uma pequena molécula que bloqueia a ativação do NLRP3, quer pelo mecanismo canónico, quer pelo mecanismo não canónico [8]. Um estudo demonstrou que esta molécula inibe a formação de IL-1 β e o acoplamento dos domínios do NLRP3 em macrófagos humanos e de rato, através do bloqueio da oligomerização do ASC [10]. Demonstrou também ser um potente inibidor do NLRP3 *in vivo* em modelos animais de CAPS [3].

Como não exerce o mesmo efeito noutros inflamassomas, como o NLRP1, o AIM2 ou o NLRC4, conclui-se que a MCC950 é um inibidor seletivo do NLRP3 [10]

O BHB é uma molécula com ação anti-inflamatória que reduz a produção de IL-1 β e IL-18, através da inibição específica da ativação do NLRP3, estando o bloqueio da oligomerização do ASC subjacente a esta inibição [10]. Ao contrário da molécula MCC950, o BHB inibe o efluxo de iões K⁺ de macrófagos e apenas interfere com o mecanismo canónico de ativação do NLRP3 [10].

Estudos científicos revelam que os níveis de BHB aumentam em situações de fome, jejum prolongado, exercício físico de alta intensidade, restrição calórica e durante dietas cetogénicas, sugerindo uma relação muito próxima entre a dieta e processos imunitários [10].

A glibenclamida (gliburida), que estruturalmente é uma sulfonilureia, trata-se de um antidiabético oral usada no tratamento da diabetes tipo 2. Este fármaco demonstrou ter atividade inibitória sobre o NLRP3 *in vitro*, requerendo, no entanto, doses elevadas *in vivo*, o que levou à ocorrência de hipoglicémias [3].

Neste sentido, foi também investigada uma pequena molécula, intermediária de síntese da glibenclamida, a 16673-34-0. Um estudo revelou que esta tem a capacidade de inibir a formação do NLRP3 em cardiomiócitos de rato sem afetar o metabolismo da glicose [3].

5.4. Inibidores da caspase-1

Tendo como objetivo reduzir a formação e secreção de IL-1 β e IL-18 e, dessa forma, reduzir os processos inflamatórios inerentes a diversas patologias, as comunidades científica e clínica têm-se focado em inúmeras abordagens terapêuticas que visam diminuir a produção destas citocinas.

Dado que a caspase-1, ao ser ativada aquando da ativação dos inflamassomas, converte as citocinas pro-inflamatórias nas suas formas ativas, desencadeando uma reação inflamatória, várias moléculas têm sido investigadas com o intuito de inibir a caspase-1 e, deste modo, controlar a resposta inflamatória. Os tetrapéptidos ac-YVAD-cmk e ac-YVAD-CHO são inibidores irreversíveis da caspase-1 [18].

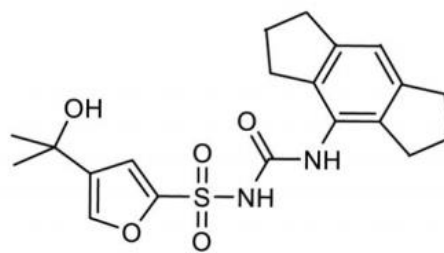


Fig. 10 – Estrutura molecular da molécula MCC950 [Retirado de 26].

Os pró-fármacos orais pralnacasan (VX-740) e belnacasa (VX-765), depois de absorvidos ao nível do trato gastrointestinal, são transformados nas suas moléculas ativas e têm uma atividade inibitória sobre a caspase-1. Os estudos em relação ao pralnacasan foram interrompidos, devido a questões de segurança do fármaco, mas o belnacasan continua a ser investigado, tendo já sido feitos ensaios clínicos de fase 1 e de fase 2 para o tratamento da epilepsia e da psoríase [8].

A talidomida é também um fármaco que, através da inibição da caspase-1, inibe os efeitos do NLRP3 e a secreção de IL-1 β , podendo exercer um papel importante como imunomodulador em situações de cancro. Contudo, o seu mecanismo anti-tumoral ainda permanece pouco estudado [19].

5.5. Antagonistas do recetor purinérgico P2X7

Como já referido, o P2X7 é um recetor purinérgico que é ativado por concentrações extracelulares elevadas de ATP, originando um efluxo de K⁺ da célula com consequente ativação do NLRP3 [18]. Encontra-se descrito que o P2X7 e o inflamassoma NLRP3 estão envolvidos na fisiopatologia do LES, sendo estas duas estruturas indicadas como alvos terapêuticos para esta e outras doenças imunes [27]. Neste sentido, descobriu-se que a molécula A-438079 é um inibidor

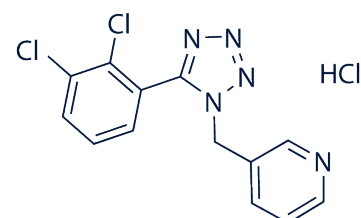


Fig. 11 – Estrutura da molécula A-438079 [Retirado de 28].

competitivo reversível dos recetores P2X7 (Fig.11) [18]. Um estudo demonstrou o efeito deste composto na redução da excreção urinária de albumina e da pressão arterial, num modelo animal de hipertensão. Estes resultados vieram demonstrar o potencial terapêutico dos inibidores do P2X7 no tratamento da hipertensão arterial [18].

5.6. Indutores da autofagia

Dado que a autofagia é um dos mecanismos que regula a atividade dos inflamassomas, uma estratégia para diminuir a sua atividade e, consequentemente, a resposta inflamatória, consiste na indução da autofagia [10].

O resveratrol, que é um composto polifenólico bem conhecido, e a arglabina são dois compostos com capacidade de induzir a autofagia. Os mecanismos pelos quais conseguem fazer essa indução estão descritos na Tabela 2 [10]. Encontra-se descrito que o resveratrol tem uma ação favorável ao nível da inibição da ativação do NLRP1, NLRP3 e NLRC4 [8].

O recetor canabinoide 2 (CB2R) tem um papel importante relativamente a doenças inflamatórias, sendo assim um promissor alvo terapêutico nestas situações. A ativação do

CB2R promove a inibição do NLRP3, uma vez que se induz a autofagia [10], estando o mecanismo celular e molecular inerente indicado na Tabela 2.

Tabela 2 – Mecanismos pelos quais os indutores da autofagia inibem a ação dos inflamassomas [Adaptado de 8, 10].

CLASSE	MOLÉCULA	MECANISMO DE AÇÃO
Indutores da autofagia	Resveratrol	Previne danos mitocondriais.
	Arglabina	Reduz os níveis de colesterol.
	Agonista do CB2R	Inibe o <i>priming step</i> da ativação do NLRP3.

5.7. MicroRNA

Os MicroRNAs são pequenas cadeias duplas de RNA endógeno não codificante que se ligam às regiões 3' do mRNA codificante, no sentido de regular a sua tradução. O MicroRNA-233 liga-se a uma região conservada na porção 3' do RNA transcrito que codifica o NLRP3 e inibe a sua tradução, impedindo a ativação do inflamassoma [10]. Uma deficiência deste MicroRNA origina neutrofilia e inflamação pulmonar, que surgem de forma espontânea em ratos [10].

Além destes, outros MicroRNAs, como é o caso do MicroRNA-155, MicroRNA-377 e MicroRNA-133a1 estão também envolvidos no processo de ativação do NLRP3 [10].

5.8. Isoliquiritigenina

As raízes e os rizomas de plantas do género *Glycyrrhiza* são usadas há mais de 4000 anos na medicina tradicional. Entre elas encontra-se a *Glycyrrhiza uralensis*, muito utilizada no Japão, da qual se isolam inúmeros compostos, como flavonóides, isoflavonóides, chalconas e saponinas triterpénicas [29]. Um dos compostos isolados desta planta é a isoliquiritigenina (ILG), um flavonóide com estrutura de chalcona (Fig.12). Esta molécula tem atividade antiagregante plaquetar, antialérgica, anti-angiogénica e anti-tumoral [29]. Além disto, um estudo demonstrou que a ILG inibe a formação de IL-1 β através de um potente efeito inibitório que tem sobre o NLRP3 (Anexo 4) [29].

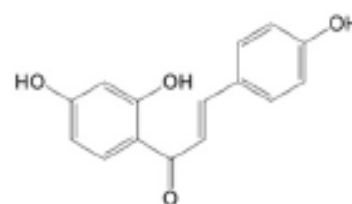


Fig. 12 – Estrutura molecular da isoliquiritigenina [Retirado de 29].

Outro composto que pode ser isolado desta planta é a glicirrizina (GL), uma molécula que também tem efeito inibitório sobre o NLRP3 e o inflamassoma AIM2 (Anexo 4) [29].

5.9. Extrato de *Paeonia lactiflora Pallas*

A psoríase é uma doença da pele que está relacionada com uma reação inflamatória crônica nas células da epiderme, caracterizada por hiper-proliferação e alteração da diferenciação dos queratinócitos [30].

A *Paeonia lactiflora Pallas* é uma planta medicinal muito usada em países orientais pelos seus efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e anti-metastáticos.

Um estudo realizado com o objetivo de identificar novas estratégias terapêuticas para a psoríase, testou o efeito do extrato de *Paeonia lactiflora Pallas* (PE) ao nível da inflamação em queratinócitos, células que têm um papel de grande relevância na ativação da imunidade inata [30]. O PE é constituído por paeonósido, paeoniflorina, paeonol, β -sitosterol e galhotanina [30]. Para desencadear a ativação do NLRP3 e, conseqüentemente, induzir uma resposta inflamatória, utilizou-se o estímulo ácido poli-inosínico : ácido policitidílico (poli (I:C)), que estruturalmente se assemelha a uma dsRNA e que tem uma ação imunoestimulatória [30].

Este estudo demonstrou que apesar do poli (I:C) ativar o TLR3 e induzir a produção de IL-1 β em queratinócitos, por uma via que envolve a ativação do inflamassoma NLRP3, na presença de PE a secreção de IL-1 β é inibida, bem como a ativação da caspase-1. Estes resultados sugerem que o PE tem um efeito inibitório na ativação do NLRP3 [30].

5.10. X-shaped DNA

A imunoterapia tem sido uma das áreas que se tem revelado bastante promissora no tratamento do cancro. As moléculas que estimulam PRRs desencadeiam a ativação de uma série de processos imunológicos, quer da imunidade inata, quer da imunidade adaptativa, podendo ser úteis no tratamento do cancro [31].

Um estudo, focado nesta temática, desenvolveu dois tipos de X-shaped DNA (X-DNA) de cadeia dupla, um deles composto por quatro cadeias de DNA numa estrutura única, X₅-DNA, e o outro formado pela ligação de moléculas de X₅-DNA umas às outras, o X_L-DNA [31]. Este estudo demonstrou que tanto o X_L-DNA, como o X₅-DNA, têm a capacidade de ativar inflamassomas, promovendo a transformação da pro-caspase-1 em caspase-1 e a da pro-IL-1 β em IL-1 β [31]. O X_L-DNA e o X₅-DNA promovem a ativação dos inflamassomas numa relação dependente da dose, sendo o X_L-DNA a forma mais potente [31].

Estes dados demonstram que o X-DNA é um bom adjuvante imunológico e que poderá ser utilizado em combinação com terapêuticas anticancerígenas, dada a sua

capacidade de ativar o sistema imunitário. Desta forma, pode ser possível reduzir as doses da quimioterapia e, por conseguinte, os seus efeitos secundários [31].

5.11. Antioxidantes

Além de todos os fármacos anteriormente referidos, têm-se procurado outras abordagens e estratégias que visionam controlar os mecanismos moleculares que ativam os inflamassomas. Neste sentido, algumas moléculas com carácter antioxidante têm-se revelado eficazes na modulação do perfil inflamatório intracelular [32].

Assim, na Tabela 3 referem-se alguns antioxidantes que têm sido estudados com este objetivo e os mecanismos moleculares responsáveis pela modulação da ativação dos inflamassomas.

Tabela 3 – Compostos antioxidantes que modulam a ação dos inflamassomas [Adaptado de 8, 32]

MOLÉCULA	CLASSIFICAÇÃO	AÇÃO
Citral (<i>Litsea cubeba</i>)	Aldeído monoterpénico insaturado acíclico	Ação anti-inflamatória relacionada com a inibição da ativação do NLRP3, embora não interfira com o <i>priming step</i> da sua ativação.
Rutina	Derivado da quercetina	Diminuição da expressão de caspase-1, ASC e NLRP3 em ratos.
Apigenina	Flavonoide	Diminuição da ativação de NF-kB e do NLRP3.
Curcumina (<i>Curcuma longa</i>)	Polifenol	Inibição da cicloxigenase 2 (COX-2) e da lipoxigenase (LP). Inibição da ativação do NLRP3 numa linha celular neuronal humana com deficiência em TXNIP. Indução de piroptose em células cancerígenas devido à inibição do fator NK-kB. Diminuição da secreção de IL-1 β .
Emodina	Antraquinona	Diminuição da ativação do NLRP3 na presença de ATP e cristais de ureia <i>in vitro</i> .
Nuciferina	Alcaloide	Inibição da ativação do NLRP3 num modelo de inflamação renal.

Estas e outras moléculas antioxidantes já estudadas exercem efeito ao nível da inibição da atividade dos inflamassomas, através de processos moleculares que envolvem a ativação do fator NK-kB, a produção de ROS, o influxo de iões cálcio, o efluxo de iões potássio e a síntese de componentes dos inflamassomas [32].

6. Conclusão

A inflamação corresponde a uma resposta inata do organismo humano a estímulos agressores, com efeito normalmente protetor para o hospedeiro. Contudo, o paradigma do envolvimento dos processos inflamatórios ao nível de muitas doenças que afetam o ser humano tem vindo a mudar. Atualmente, sabe-se que uma reação inflamatória pode estar na génese ou associada à fisiopatologia de inúmeras doenças, quer estas sejam provocadas por microrganismos patogénicos, como vírus, parasitas e bactérias, quer por distúrbios metabólicos.

Os inflamassomas são complexos proteicos multiméricos intracelulares que se formam na presença de estímulos internos e externos e que têm a capacidade de promover a produção e libertação de IL-1 β e IL-18, duas citocinas pro-inflamatórias.

Tendo em conta o efeito da ativação dos inflamassomas na fisiopatologia de diversas doenças, vários estudos científicos têm-se centrado na identificação de fármacos capazes de inibir a ativação dos mesmos. Neste sentido, existem já disponíveis alguns fármacos não seletivos que inibem os efeitos decorrentes da ativação dos inflamassomas. Além disto, torna-se crucial identificar novos fármacos e outras abordagens terapêuticas que atuem seletivamente nas estruturas que constituem os inflamassomas, para assim modularem a sua atividade.

Esta é uma das áreas da imunoterapia onde mais se tem investigado, dada a sua relevância e o seu envolvimento em tantas patologias atuais, nomeadamente neurodegenerativas, cardiovasculares, metabólicas e autoimunes. O futuro passa por clarificar e identificar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na ativação dos inflamassomas e na fisiopatologia dessas doenças, de modo a identificar novos alvos terapêuticos suscetíveis de manipulação farmacológica e modulação da atividade dos inflamassomas.

Referências Bibliográficas

1. MARTINS, J.D., LIBERAL, J., SILVA, A., FERREIRA, I., NEVES, B.M., CRUZ, M.T. – **Autophagy and Inflammasome Interplay**. DNA and Cell Biology. 34, 4 (2015), 274-281.
2. GARIB, F. Yu., RIZOPULU, A.P., KUCHMIY, A. A., GARIB, V. F. – **Inactivation of Inflammasomes by Pathogens Regulates Inflammation**. Biochemistry (Moscow). 81, 11 (2016), 1326-1339.
3. FERREIRA, I., LIBERAL, J., MARTINS, J.D., SILVA, A., NEVES, B.M., CRUZ, M.T. – **Inflammasome in dendritic cells immunobiology: implications to diseases and therapeutic strategies**. Current Drug Targets. 18, 6 (2017), 1003-1018.
4. GUO, H., CALLAWAY, J.B., TING, J. – **Inflammasomes: Mechanism of Action, Role in Disease and Therapeutics**. Nature Medicine. 21, 7 (2015), 677-687.
5. ZHOU, K., SHI, L., WANG, Y., CHEN, S., ZHANG, J. – **Recent Advances of the NLRP3 Inflammasome in Central Nervous System Disorders**. Journal of Immunology Research. (2016).
6. SCHEFF, G., DAYER, J., MANGER, B. – **Interleukin-1 function and role in rheumatic disease**. Nature Reviews Rheumatology. 12 (2016), 14-24.
7. OWEN, J., PUNT, J., STANDFORD, S., JONES, P. - **Kuby Immunology**. 7ª Edição. Nova Iorque: W. H. Freeman and Company, Nova Iorque, 2013. ISBN-13: 978-14292-1919-8.
8. FENINI, G., CANTASSOT, E., FRENCH, L. – **Potential of IL-1, IL-18 and Inflammasome Inhibition for the Treatment of Inflammatory Skin Diseases**. Frontiers in Pharmacology. 8 (2017).
9. ZWICKER, S., HATTINGER, E., BUREIK, D., BATYCKA-BARAN, A., SCHMIDT, A., GERBER, P., ROTHENFUSSER, S., GILLIET, M., RUZICKA, T., WOLF, R. - **Th17 micro-milieu regulates NLRP1- dependent caspase-5 activity in skin autoinflammation**. PLoS ONE. 12, 4 (2017).
10. SHAO, B., XU, Z., HAN, B., SU, D., LIU, C. - **NLRP3 inflammasome and its inhibitors : a review**. Frontiers in Pharmacology. 6 (2015).
11. KHAMENEH, H., MORTELLARO, A. – **NLRP4 gets out of control**. Nature Genetics. 46 (2014), 1048-1049.
12. ZHONG, Z., ZHAI, Y., LIANG, S., MORI, Y., HAN, R., SUTTERWALA, F., QIAO, L. - **TRPM2 links oxidative stress to the NLRP3 inflammasome activation**. Nature Communications. 4 (2013).

13. WANG, S., LEI, T., ZHANG, K., ZHAO, W., FANG, L., LAI, B., HAN, J., XIAO, L., WANG, N. - **Xenobiotic Pregnane X Receptor (PXR) Regulates Innate Immunity via Activation of NLRP3 Inflammasome in Vascular Endothelial Cells.** *The Journal of Biological Chemistry.* 289, 43 (2014), 30075-30081.
14. MORIYAMA, M., CHEN, I., KAWAGUCHI, A., KOSHIBA, T., NAGAT, K., TAKEYAMA, H., HASEGAWA, H., ICHINOHE, T. - **The RNA- and TRIM25-Binding Domains of Influenza Virus NSI Protein Are Essential for Suppression of NLRP3 Inflammasome-Mediated Interleukin-1 β Secretion.** *Journal of Virology.* 90, 8 (2016), 4105-4114.
15. GUO, H., JIN, Y., ZHI, X., YAN, D., SUN, S., - **NLRP3 Inflammasome Activation by Viroporins of Animal Viruses.** *Viruses.* 7 (2015), 3380-3391.
16. ZWOLANEK, F., RIEDELBERGER, M., STOLZ, V., JENULL, S., ISTELE, F., KOPRULU, A., ELLMEIER, W., KUCHLER, K. - **The Non-receptor Tyrosine Kinase Tec Controls Assembly and Activity of the Noncanonical Caspase-8 Inflammasome.** *PLoS Pathogens.* 10, 12 (2014).
17. ZHONG, Z., SANCHEZ-LOPEZ, E., KARIN, M. - **Autophagy, NLRP3 inflammasome and auto-inflammatory/immune diseases.** *Clinical and Experimental Rheumatology.* 34 (2016).
18. KRISHNAN, S., SOBEY, C., LATZ, E., MANSELL, A., DRUMMOND, G. - **IL-1 β and IL-18: inflammatory markers or mediators of hypertension.** *British Journal of Pharmacology.* 171, 24 (2014), 5589-5602.
19. THI, H., HONG, S. - **Inflammasome as a Therapeutic Target for Cancer Prevention and Treatment.** *Journal of Cancer Prevention.* 22, 2 (2017), 62-73.
20. WESTBOM, C., THOMPSON, J., LEGGETT, A., MACPHERSON, M., BEUSCHEL, S., PASS, H., VACEK, P., SHUKLA, A. - **Inflammasome Modulation by Chemotherapeutics in Malignant Mesothelioma.** *PLoS ONE.* 10, 12 (2015).
21. TRICARICO, P., KLEINER, G., PISCIANZ, E., ZANIN, V., MONASTA, L., CROVELLA, S., MARCUZZI, A. - **Temperature and Drug Treatments in Mevalonate Kinase Deficiency: An Ex Vivo Study.** *BioMed Research International.* (2013).
22. OTANI, K., TANIGAWA, T., WATANABE, T., SHIMADA, S., NADATANI, Y., NAGAMI, Y., TANAKA, F., KAMATA, N., YAMAGAMI, H., SHIBA, M., TOMINAGA, K., FIJIWARA, Y., ARAKAWA, T. - **Microbiota Plays a Key Role in Non-Steroid Anti-Inflammatory Drug-Induced Small Intestinal Damage.** *Digestion.* 95 (2017), 22-28.

23. VAINE, C., PATEL, M., ZHU, J., LEE, E., FINBERG, R., HAYWARD, R., KURT-JONES, E. – **Tuning innate immune activation by surface texturing of polymer microparticles: the role of shape in inflammasome activation.** *The Journal of Immunology.* 190, 7 (2013), 3525-3532.
24. WILSON, N., DUEWELL, P., YANG, B., LI, Y., MARSTERS, S., KOERING, S., LATZ, E., MARASKOVSKY, E., MORELLI, A., SCHNURR, M., ASHKENAZI, A. - **Inflammasome-Dependent and -Independent IL-18 Production Mediates Immunity to the ISCOMATRIX Adjuvant.** *The Journal of Immunology.* 192, 7 (2014).
25. MORELLI, A., BECHER, D., KOERNIG, S., SILVA, A., DRANE, D., MARASKOVSKY, E. - **ISCOMATRIX: a novel adjuvant for use in prophylactic and therapeutic vaccines against infectious diseases.** *Journal of Medical Microbiology.* 61 (2012), 935-943.
26. COLL, R., ROBERTSON, A., CHAE, J., HIGGINS, J., NUÑOZ-PLANILLO, R., INSERRA, M., VETTER, I., DUNGAN, L., MONKS, B., STUTZ, A., CROKER, D., BUTLER, M., HANEKLAUS, M., SUTTON, C., NÚÑEZ, G., LATZ, E., KASTNER, D., MILLS, K., MASTERS, S., SCHRODER, K., COOPER, M., O'NEILL, L. – **A small molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome is a potential therapeutic for inflammatory diseases.** *Nature Medicine.* 21, 3 (2015), 248-255.
27. SAVIO, L., COUTINHO-SILVA, R. – **Purinergic signaling in infection and autoimmune disease.** *Biomedical Journal.* 39 (2016), 304-305.
28. **A-438079.** [Acedido a 12 de agosto de 2017]. Disponível na *Internet:* <http://www.abcam.com/a-438079-ab120413.html>.
29. HONDA, H., NAGAI, Y., MATSUNAGA, T., OKAMOTO, N., WATANABE, Y., TSUNEYAMA, K., HAYASHI, H., FUJII, I., IKUTANI, M., HIRAI, Y., MURAGUCHI, A., TAKATSU, K. – **Isoliquiritigenin is a potent inhibitor of NLRP3 inflammasome activation and diet-induced adipose tissue inflammation.** *Journal of Leukocyte Biology.* 96, 6 (2017), 1087-1100.
30. CHOI, M., CHOI, D., SOHN, K., LIM, S., KIM, D., LEE, Y., IM, M., LEE, Y., SEO, Y., KIM, C., LEE, J. - **Inhibitory effect of Paeonia lactiflora Pallas extract (PE) on poly (I:C)-induced immune response of epidermal keratinocytes.** *International Journal of Clinical and Experimental Pathology.* 8, 5 (2015), 5236-5241.
31. KOO, J., SHIN, S., UM, S., LEE, J. - **X-shaped DNA potentiates therapeutic efficacy in colitis-associated colon cancer through dual activation of TLR9 and inflammasomes.** *Molecular Cancer.* 14, 104 (2015).

32. DUTARTRE, P. – **Inflammasomes and Natural Ingredients towards New Anti-Inflammatory Agents**. *Molecules*. 21, 11 (2016).

Anexo I

A Fig. 13 ilustra os mecanismos de modulação da ativação de inflamassomas induzida por fatores de virulência de origem bacteriana e viral. Os mecanismos de inibição do acoplamento e ativação dos inflamassomas encontram-se representados a vermelho [2].

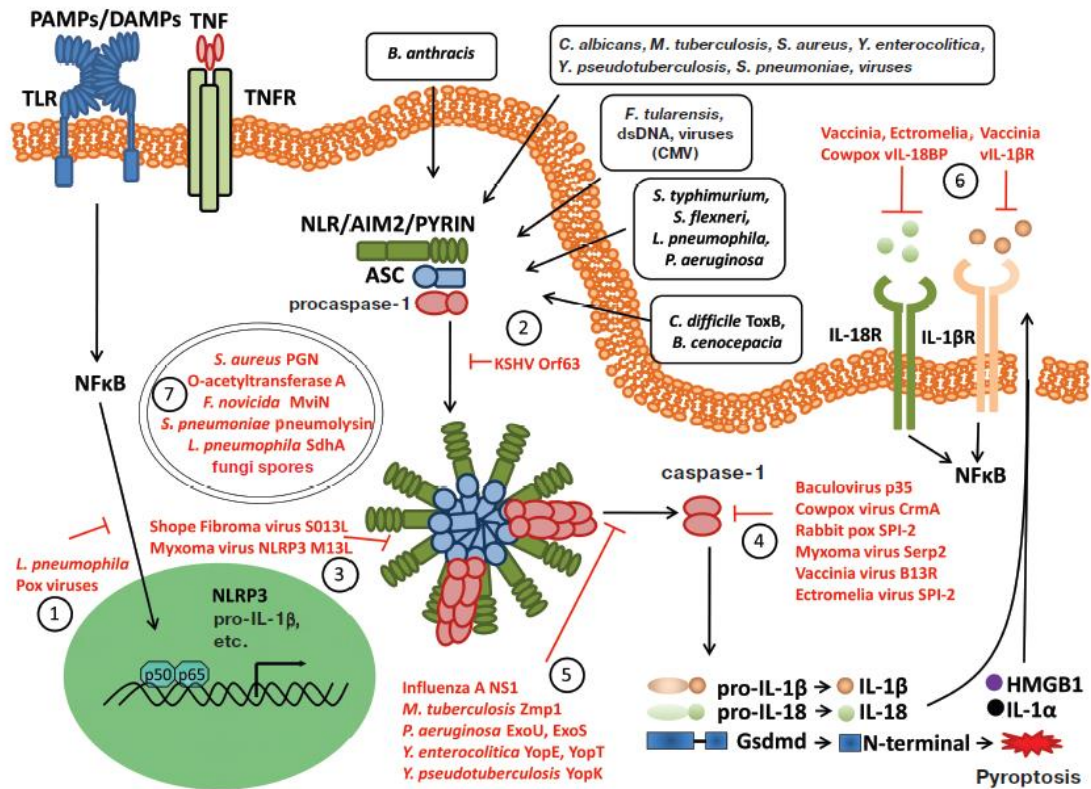


Fig. 13 – Mecanismos de modulação da ativação de inflamassomas provocados por fatores de virulência virais e bacterianos: 1 – Inibição da translocação nuclear do NK-κB; 2 – O homólogo viral KSHV Orf63, um homólogo do inflamassoma NLRP1, interage com os NLRP1 e NLRP3 humanos e inibe a sua ativação; 3 – Na presença das proteínas virais vPOPs é inibido o recrutamento de pro-caspase-1; 4 – Inibição direta da atividade da caspase-1 provocada, por exemplo pela serpina CrmA do vírus Cowpox; 5 – Inibidores indiretos da ativação do inflamassoma, nomeadamente a proteína NS1 dos vírus Influenza e a ExoS das *Pseudomonas aeruginosa*, entre outras; 6 – Bloqueio da ativação dos receptores da IL-1β e da IL-18 através de receptores scavenger vIL-1βR e vIL-18BR; 7 – Processos “discretos” pelos quais alguns agentes patogénicos evitam a inflamação, como é o caso da *L. pneumophila*, que utiliza a sua proteína SdhA para mascarar os seus antígenos e, dessa forma, escapar ao reconhecimento por parte do inflamassoma [Retirado de 2].

Anexo 2

A Tabela 4 apresenta os fatores de virulência de alguns vírus e os mecanismos pelos quais os mesmos inibem os inflamassomas [Retirado de 2].

VIRUS	EVASION FACTOR	MECHANISM OF ACTION
Cowpox virus	CrmA (serpina)	Inhibits activity of caspase-1 and caspase-8, interfering with generation of active forms of IL-1 β and IL-18.
Vaccinia, Ectromelia and Cowpox viruses	vIL-18BP (viral homolog of cell IL-18BP)	Viral genes encode homologs of host IL-18 binding proteins that prevent activation of NF- κ B, thus downregulating activity of inflammasomes and induction of IFN γ in response to IL-18.
KSHV/HHV8 (Kaposi's sarcoma associated Herpes virus)	Orf63 KSHV (viral homolog of inflammasome NLRP1 lacking PYD and CARD domains)	Blocks NLRP1, NLRP3, and NOD2 dependent responses: activation of caspase-1 and processing of IL-1 β and IL-18.
Poxvirus	Encodes PYD-containing protein	Interacts with ASC, inhibits activation of caspase-1 and processing of IL-1 β and IL-18.
Myxomatosis cuniculorum virus and Shope fibroma virus	Viral homologs M013L and S013L, respectively, act as PYD-only protein homologs (viral POPs), an integral part of inflammasome	vPOPs interact with ASC, inhibit PYD-mediated signal transduction by blocking activation of procaspase-1 and processing of pro-IL-1 β .
Measles virus	V protein	Directly or indirectly interacts with NLRP3 and inhibits IL-1 β secretion.

Anexo 3

Resultados de um estudo científico que comprova o efeito anti-tumoral resultante da associação de cisplatina com anakinra, um antagonista dos recetores de IL-1, com consequente inibição do crescimento tumoral do Mesotelioma Maligno, num modelo intraperitoneal de rato (Fig.14) [20].

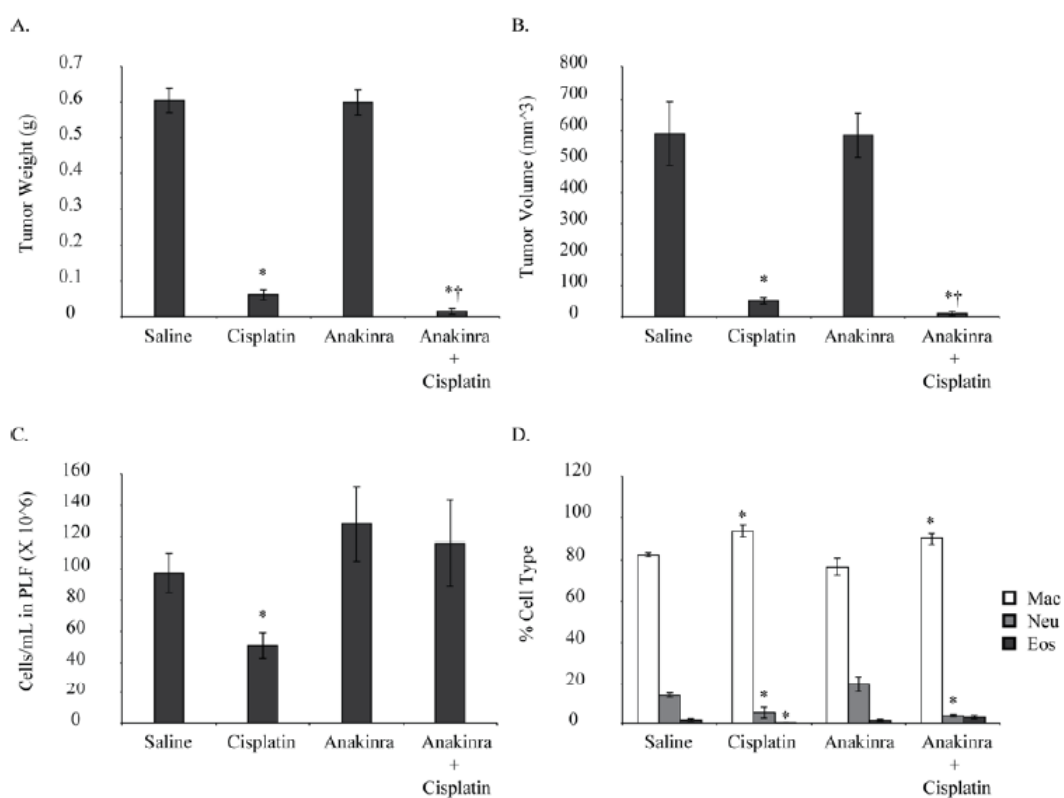


Fig. 14 – Resultados da associação de cisplatina com anakinra na redução do crescimento tumoral de MM, num modelo intraperitoneal de rato. A – Redução drástica do peso tumoral no grupo com a associação de fármacos. B – Redução drástica do volume tumoral no grupo com a combinação de fármacos. C – O número total de células não foi afetado pela combinação de fármacos. D – O número de neutrófilos foi bastante mais baixo nos grupos que foram tratados com cisplatina e com a combinação de fármacos [Retirado de 20].

Anexo 4

A Fig.15 ilustra os mecanismos pelos quais a glicirrizina (GL) e a isoliquiritigenina (ILG), extraídas da *Glycyrrhiza uralensis*, atuam nos inflamassomas NLRP3 e AIM2 [28].

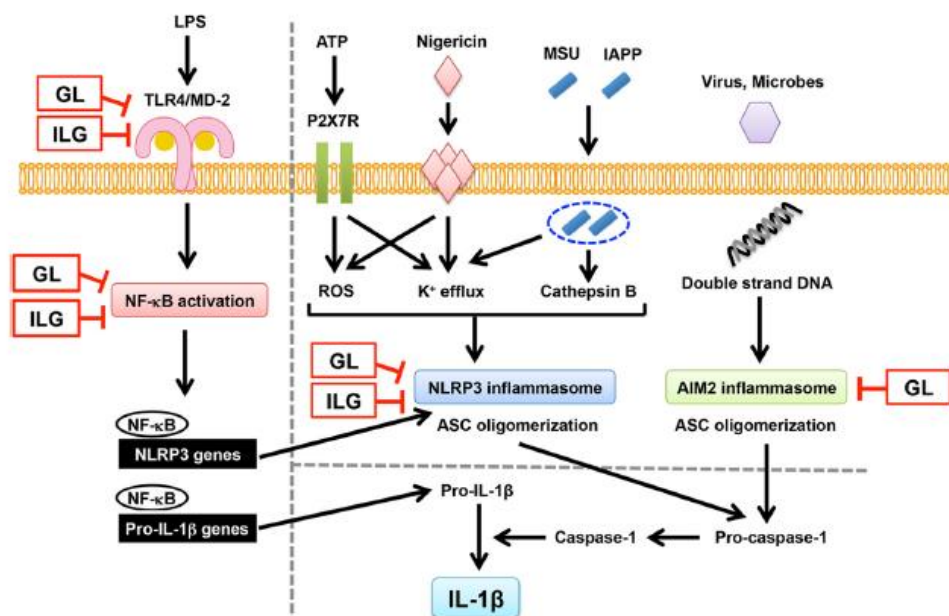


Fig. 15 – Mecanismos de inibição do NLRP3 pela GL e pela ILG e de inibição do AIM2 pela GL. A GL e a ILG podem inibir a ativação dos receptores TLR4 ou MD-2, que reconhecem LPS, o que leva à supressão da ativação do NF-κB, não havendo expressão genética dos genes que codificam o NLRP3 e a pro-IL-1β. Por outro lado, a ILG pode interagir diretamente com NF-κB e inibi-lo, enquanto a GL inibe a sua capacidade transcritora. A GL também inibe a ação do inflamassoma AIM2 [Retirado de 28].