

Farmácia Estádio



Ana Sofia Silva Abrunheiro

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Vacina Universal do vírus influenza: Mito ou Realidade?” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dra. Ana Isabel Rebelo, Engenheira Maria Eugénia Amaral e da Professora Doutora Ana Miguel Matos 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

Ana Sofia Silva Abrunheiro

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Vacina Universal do vírus influenza: Mito ou Realidade?” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dra. Ana Isabel Rebelo, Engenheira Maria Eugénia Amaral e da Professora Doutora Ana Miguel Matos 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

Eu, Ana Sofia Silva Abrunheiro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2012170756, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Vacina Universal do vírus influenza: Mito ou Realidade?” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 4 de setembro de 2017.

Ana Sofia Silva Abrunheiro

(Ana Sofia Silva Abrunheiro)

*“Quem busca o conhecimento e o acha, obterá dois prêmios: um por procurá-lo, e outro por achá-lo.
Se não o encontrar, ainda restará o primeiro prêmio.”*

Maomé

Agradecimentos

Com o culminar do percurso académico quero expressar a minha profunda gratidão a todos aqueles que nele estiveram presentes e que me ajudaram. Assim sendo, agradeço:

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pelos cinco anos de formação teórica, prática e multidisciplinar de máxima qualidade.

À Professora Doutora Ana Miguel Matos pela sua orientação, disponibilidade, conhecimentos partilhados, bem como pelo seu apoio e incentivo que permitiram a consecução da monografia.

À Doutora Ana Isabel Rebelo e a toda a equipa da Farmácia Estádio (Doutor André Paiva, Doutor Luís Cavaleiro, Doutora Elodie Domingues, Doutora Mónica Gomes, Senhora Dina Rodrigues, Senhora Edite Dinis, Senhor Hugo Travassos, Doutora Maria João Domingues, Doutora Carolina Cordeiro e Dona Glória Silva) pelo seu companheirismo, disponibilidade, conselhos, confiança em mim depositada e estímulo constante que possibilitaram o meu crescimento tanto na vertente pessoal, como na profissional.

À Engenheira Maria Eugénia Amaral e a toda a equipa do departamento da Garantia de Qualidade da Farmalabor (Engenheira Áurea Ferreira, Doutora Isabel Viegas, Doutor João Braga, Doutora Patrícia Fonseca, Doutora Paula Alírio e Doutora Rita Leão) pelo seu acolhimento, disponibilidade e conhecimento transmitido, que contribuíram para que o estágio se tornasse numa experiência enriquecedora quer a nível humano, quer a nível técnico-científico.

À minha família, particularmente aos meus pais e ao meu irmão pelo carinho, ânimo, compreensão e pela sua presença e apoio incondicional em todos os momentos. Sem eles este percurso não teria sido possível.

Ao Rafael pelo seu amor, paciência e amparo nesta etapa da minha vida.

A todos os meus amigos pela sincera amizade, alegria, partilha de bons momentos e pela força proporcionada ao longo do curso.

Índice

Parte I: Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária	7
Abreviaturas.....	8
Introdução	9
1. Análise SWOT	10
1.1 Análise Interna.....	10
1.1.1 Pontos Fortes	10
1.1.2 Pontos Fracos.....	15
1.2 Análise Externa.....	17
1.2.1 Oportunidades	17
1.2.2 Ameaças.....	17
2. Casos Clínicos.....	19
Considerações Finais.....	22
Referências Bibliográficas	23
Anexos	24
Parte II: Relatório em Indústria Farmacêutica.....	27
Abreviaturas.....	28
Introdução	29
Grupo Medinfar – Farmalabor	30
1. Análise SWOT	31
1.1 Análise Interna.....	31
1.1.1 Pontos Fortes	31
1.1.2 Pontos Fracos.....	35
1.2 Análise Externa	36
1.2.1 Oportunidades	36
1.2.2 Ameaças.....	37
Considerações Finais.....	38
Referências Bibliográficas	39
Anexos	40
Parte 3: Vacina Universal do vírus influenza: Mito ou Realidade?.....	44
Abreviaturas.....	45
Resumo	46
Abstract	47
Introdução	48
1. Vírus influenza	49
1.1 Estrutura	49

1.2 Ciclo de vida	50
1.3 Variabilidade antigénica.....	52
1.4 A gripe.....	52
1.5 Terapêutica Antiviral.....	53
1.6 Impacto na saúde humana.....	53
2. Vacinas Convencionais	54
2.1 Vacinas inativadas.....	55
2.2 Vacinas vivas atenuadas	56
3. Vacina Universal.....	57
3.1 Domínio da haste da HA.....	57
3.1.1 <i>Headless</i> HA.....	58
3.1.2 HAs Quiméricas	59
3.2 Ectodomínio da proteína da matriz 2.....	59
3.2.1 ACAM-FLU-A.....	60
3.2.2 VAX102.....	61
3.3 Proteínas internas (NP e MI)	62
3.3.1 MVA-NP+MI	62
3.4 Novas abordagens	64
3.4.1 Multimeric-001	64
3.4.2 FLU-v.....	65
3.4.3 FP-01.1 (Flunisyn™).....	67
3.4.4 VGX-3400X.....	68
3.4.5 Anticorpos monoclonais.....	69
3.4.5.1 TCN-032.....	70
Conclusão.....	71
Referências Bibliográficas.....	72

Parte I: Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária



Farmácia Estádio

Orientadora: Dra. Ana Isabel Rebelo

Abreviaturas

FE – Farmácia Estádio

FC – Farmácia Comunitária

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Introdução

O exercício profissional do farmacêutico tem como objetivo primordial a pessoa do doente, sendo que no desempenho desta atividade, deve ter sempre presente o elevado grau de responsabilidade que a ela está associado e o dever ético de a praticar com a maior diligência, zelo e competência (1).

Embora o conteúdo do ato farmacêutico integre diferentes áreas do exercício profissional, é ao nível da farmácia comunitária (FC) que o farmacêutico pode intervir ativamente na promoção da saúde e do bem-estar do doente e do cidadão em geral (1). O farmacêutico comunitário contacta de forma direta com o utente, apercebendo-se das suas reais necessidades, prestando aconselhamento qualificado nas mais diversas áreas relativas ao medicamento e parâmetros clínicos e promovendo a educação do doente no sentido da utilização racional do medicamento (2).

O estágio curricular em farmácia comunitária integra o 2º semestre do 5º ano do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) e visa a consolidação dos conhecimentos técnico-científicos adquiridos ao longo de todo o percurso académico, através de uma prática supervisionada e orientada.

O presente relatório tem como finalidade efetuar uma descrição e análise crítica do estágio realizado no período de 3 de abril a 30 de junho de 2017 na Farmácia Estádio (Coimbra), sob orientação da Dra. Ana Isabel Rebelo e coorientação da restante equipa técnica, recorrendo para isso à análise SWOT.

A análise SWOT é definida como uma ferramenta de gestão e planeamento estratégico de uma empresa, porém devido ao seu reduzido grau de complexidade, pode aplicar-se a outro tipo de análises, particularmente à análise do estágio curricular. Esta análise é realizada a dois níveis, interno e externo, sendo que externamente se procuram as Oportunidades (*Opportunities*) e as Ameaças (*Threats*) e internamente são avaliados os Pontos Fortes (*Strengths*) e os Pontos Fracos (*Weaknesses*) (3).

I. Análise SWOT

I.1 Análise Interna

I.1.1 Pontos Fortes

- Equipa

A Farmácia Estádio (FE) é dotada de uma equipa qualificada, prestável e pró-ativa, que está disposta a integrar, formar e apoiar novos membros. Cada colaborador está afeto a um conjunto de funções e responsabilidades perfeitamente definidas, o que se traduz num fator crucial para a organização da farmácia e para a eficiência na resolução de problemas inerentes ao funcionamento interno (atendimento e *back office*), mas também associados ao funcionamento externo (serviços aos utentes).

Ao longo do estágio pude constatar o valor que a comunicação e que o espírito de entreajuda representam para o sucesso no desempenho profissional e para o bom ambiente instalado entre a equipa. De facto, existiu sempre um clima propício à aprendizagem, caracterizado pela troca de opiniões e também pela cooperação nas mais diversas atividades.

Toda a equipa foi fundamental para que o estágio se tornasse numa experiência enriquecedora tanto a nível técnico-científico, como a nível humano, demonstrando sempre disponibilidade para esclarecer qualquer dúvida e transmitir a informação necessária de modo a agir assertivamente. Igualmente importante foi a autonomia e estímulo constante que a equipa me proporcionou no desempenho das diferentes atividades.

- Projeto Kaizen

O projeto Kaizen consiste num método de gestão de origem japonesa, criado em 1986 por Masaaki Imai e que ambiciona a prática de uma melhoria contínua de todas as pessoas, todos os dias e em todas as áreas (“Kai” – mudar; “zen” – melhor). Tem como objetivo conferir vantagem competitiva a longo prazo às organizações, neste caso específico à FE, através do aumento da produtividade, rentabilização e motivação dos recursos, eliminação de desperdícios, otimização dos equipamentos e diminuição do período de tempo afeto à resolução de eventuais problemas. Este projeto defende que pequenas mudanças ao longo do tempo se traduzem em grandes resultados e que toda a equipa deve estar envolvida nesse processo (4).

Na FE, este método de gestão, implementado desde março de 2016, está fisicamente representado por um quadro visível para toda a equipa (Anexo I). Neste quadro são registadas as atividades a desenvolver por cada um dos profissionais (Tabela *Plan, Do, Check* e

Act), os problemas que vão emergindo e o estado atual da tentativa de resolução, os indicadores de performance, os objetivos já alcançados e as sugestões de melhoria.

A nível pessoal, este projeto revelou-se profícuo para a minha formação, já que ao acompanhar as “reuniões Kaizen” (realizadas 3 vezes por semana durante um período máximo de 15 minutos) pude fomentar o meu espírito crítico através da exposição das minhas ideias, perspetivas e possíveis soluções de determinados problemas, melhorar o meu desempenho nas atividades em que não estava tão bem posicionada tendo em conta os indicadores de performance e aperceber-me, de uma forma global, de toda a realidade inerente a uma FC.

- Evolução gradual do estágio

O meu plano de estágio foi organizado com a finalidade de possibilitar uma adaptação progressiva à realidade da FC e, conseqüentemente a minha integração na equipa e nas várias atividades. De facto, a integração por fases representou uma mais-valia na minha formação, pois é essencial conhecer a organização da farmácia, a sua vasta gama de produtos e perceber como se processa todo o trabalho de *back office*, para que no momento do atendimento ao utente seja prestado um serviço de maior qualidade.

Assim, e após uma prévia apresentação da equipa e das instalações da farmácia, bem como do Manual de Acolhimento e Integração, as primeiras semanas do estágio foram dedicadas à receção, ao aprovisionamento e à gestão de *stocks*.

A receção e o aprovisionamento de encomendas permitiram-me efetuar uma triagem dos produtos que fazem parte do *stock* da farmácia, familiarizando-me com os princípios ativos, nomes comerciais e formas farmacêuticas e apercebendo-me da rotatividade dos diferentes produtos. A fase de receção foi igualmente importante para perceber os fornecedores existentes e os horários de entrega, como também o controlo dos produtos que constituem a encomenda. Esse controlo é caracterizado pela verificação do aspeto exterior das embalagens, dos prazos de validade, dos preços e pela confirmação dos produtos que efetivamente se encontram na encomenda (tendo em atenção a ausência ou troca de produtos). Para além disso, foi nesta etapa que apreendi o modo de proceder relativamente a produtos reservados ou que eram propriedade do utente. A fase de aprovisionamento possibilitou-me ainda assimilar o local de armazenamento de cada um dos produtos (módulos de gavetas deslizantes, frigorífico, armários, gôndolas e prateleiras).

Durante estas semanas iniciais pude também atestar o papel crucial da gestão dos produtos disponíveis na farmácia na sua estrutura e funcionalidade. A gestão de *stock* requer um estudo de mercado e deve ter em conta determinados fatores, tais como a localização

da farmácia, as diferentes populações, os hábitos de prescrição, a época do ano e, não menos importante, a capacidade financeira da farmácia. Embora não detivesse a responsabilidade de gestão do *stock*, pude participar nesse processo através da elaboração de devoluções e deteção de erros de *stock* (contagem física).

Ainda durante as primeiras semanas do estágio tive oportunidade de receber formação inerente ao Gabinete do Utente, que contemplou não só a forma de proceder à determinação de parâmetros fisiológicos (tensão arterial) e bioquímicos (glicémia capilar, colesterol total e triglicéridos), como também a análise do valor obtido considerando os valores de referência. Foi neste contexto que comecei a experienciar o contacto direto com os utentes, valorizando a educação para a saúde. Na presença de alterações significativas dos parâmetros clínicos encaminhava o utente para outros serviços de saúde.

Numa fase posterior foram-me elucidadas as várias potencialidades do *software* Sifarma 2000®, particularmente no menu “Atendimento”, e o modo de organização do receituário (organismos e lotes).

Por último, iniciei o atendimento ao público, colocando em prática os conteúdos adquiridos ao longo do percurso académico e assimilando novos conhecimentos perante novas experiências. Os primeiros contactos com o utente foram realizados com acompanhamento da equipa técnica, o que me permitiu adaptar à função e adquirir gradualmente confiança e autonomia.

- Localização da farmácia

A FE, inserida na estrutura física do Estádio Académico da cidade de Coimbra, apresenta uma localização de excelência, não apenas pela afluência de pessoas ao Estádio, mas também pela proximidade a um centro comercial, escolas, zonas residenciais e clínicas particulares, estando algumas delas associadas a medicinas alternativas (homeopatia). Esta localização origina uma grande heterogeneidade de público, desde os utentes pontuais, aos utentes fidelizados.

O contacto com diferentes classes etárias e socioculturais e até com utentes com diferentes níveis de fidelização, demonstrou-se deveras importante no sentido de me proporcionar o desenvolvimento de ferramentas que serão fundamentais em contexto laboral, designadamente a capacidade de adaptação à singularidade de cada pessoa, de comunicação e de gestão de conflitos.

- Forte componente em medicamentos manipulados e reconstituição de preparações extemporâneas

A preparação de medicamentos manipulados, *fac secundum artem*, a partir de matérias-primas existentes no laboratório da farmácia, revela-se como parte integrante da prática farmacêutica. Para além disso, representa uma atividade fundamental que permite a personalização da terapêutica, tendo em conta o perfil fisiopatológico do doente, preenchendo lacunas ao nível das formas farmacêuticas ou associações de substâncias inexistentes no mercado (5).

Apesar de na atualidade se atestar um decréscimo nos medicamentos manipulados, a FE continua a apresentar um número considerável de requisições para elaboração destes medicamentos. Deste modo, foi-me dada a oportunidade de acompanhar de perto e ajudar na preparação de medicamentos manipulados: pomada de vaselina e enxofre e solução alcoólica de minoxidil. Após a elaboração, o preenchimento da respetiva ficha de preparação (Anexo 2) e da rotulagem (Anexo 3), é efetuado o cálculo do preço do medicamento manipulado.

Ao longo do estágio tive também a possibilidade de reconstituir algumas preparações extemporâneas de antibióticos. Este procedimento apenas deve ser realizado no momento da dispensa devido à instabilidade destas preparações. É essencial o rigor na obtenção de uma diluição correta de forma a garantir que a dose de antibiótico é a indicada. No momento de dispensa aconselhei aos utentes o armazenamento do medicamento em condições específicas, e a agitação antes de cada administração.

Esta experiência permitiu-me consolidar e colocar em prática os conhecimentos adquiridos em contexto académico, mais especificamente na disciplina de Farmácia Galénica.

- Potencialidades do Sifarma 2000®

Na FE o sistema informático instalado é o Sifarma 2000®. Na minha opinião corresponde a um *software* simples de utilizar e destaco-o como um ponto forte do meu estágio, pois fornece ferramentas essenciais quer ao nível do *back office*, quer ao nível do atendimento ao público.

No que diz respeito ao *back office*, é importante realçar o seu papel na gestão e receção de encomendas, na gestão do *stock* e na acessibilidade à ficha do produto e às funcionalidades que lhe estão associadas (informações de lotes, *stock*, reservas ou propriedades de utentes, encomendas em curso).

Em *front office*, o programa permite a realização de um atendimento eficiente e personalizado, prevenindo a ocorrência de possíveis erros de medicação. Desde logo

possibilita o acesso ao histórico da medicação do utente (utente fidelizado) e o esclarecimento de dúvidas momentâneas relativas à informação científica do produto (posologia, indicações terapêuticas, efeitos adversos, contraindicações e interações medicamentosas) ou a informação de carácter mais técnico (stock e disponibilidade ao nível do fornecedor). No final do atendimento é ainda possível efetuar uma verificação dos produtos através da leitura ótica dos códigos de barras. Esta particularidade do sistema revela-se de extrema importância, visto que permite detetar, antes da cedência ao utente, trocas de medicação, na maioria das vezes relacionadas com a similaridade das embalagens de um mesmo laboratório de diferentes dimensões de embalagem (diferente número de comprimidos) e/ou dosagens.

- Prescrição eletrónica

A prescrição por via eletrónica consiste na prescrição de medicamentos resultante da utilização de soluções ou de equipamentos informáticos, sendo que a mesma se pode apresentar sob duas formas distintas, materializada (impressão da receita médica) ou desmaterializada (receita sem papel, acessível e interpretável por meio de equipamento eletrónico) (6).

Considero que a prescrição eletrónica contribuiu positivamente para o meu estágio, uma vez que permite minimizar a possibilidade de ocorrência de erros associados à confirmação da autenticidade da receita e à cedência de medicamentos e o tempo afeto à conferência do receituário. Todas as vantagens anteriormente enumeradas providenciaram as condições necessárias para que o processo de dispensa de medicamentos se tornasse mais ágil e rápido e, simultaneamente, apresentasse qualidade no que diz respeito às indicações clínicas a prestar.

- Discussão de casos clínicos

No decorrer do estágio, especialmente numa fase inicial, fui estimulada pela equipa técnica a analisar casos práticos referentes a várias temáticas, tais como dermocosmética, contraceção oral de emergência, tosse, distúrbios gastrointestinais, entre outros. Esta análise tinha como finalidade relembrar e consolidar conhecimentos teóricos abordados durante o curso, efetuar uma interligação entre as situações clínicas e produtos disponíveis na farmácia, esclarecer eventuais dúvidas e proporcionar o suporte necessário para a fase de atendimento ao público. Este suporte proporcionou a informação indispensável a prestar para a correta utilização dos medicamentos, como também fomentou a minha atitude crítica no sentido de identificar e resolver possíveis problemas relacionados com os medicamentos.

- Grupo maisfarmácia

A FE integra o Grupo maisfarmácia com a finalidade de adquirir produtos a preços mais baixos, permitindo alcançar margens de lucro superiores e contribuindo, desta forma, para uma maior sustentabilidade financeira.

O Grupo maisfarmácia, representado pelo *pharmacycoacher*, proporciona a oportunidade de frequentar ações de formação no interior da própria farmácia e durante o seu horário de funcionamento. Uma das formações a que pude assistir abordava a temática dos bucodentários, possibilitando-me não só relembrar conceitos e colmatar lacunas pessoais nesta área, como também para conhecimento do portefólio de produtos de uma marca específica e promoção de técnicas de venda (*cross-selling* e *up-selling*). Todos estes fatores representaram indubitavelmente uma mais-valia para a prestação de um serviço personalizado e de qualidade.

1.1.2 Pontos Fracos

- Correspondência entre nomes comerciais e respetivo princípio ativo

A incapacidade de associar os nomes comerciais dos medicamentos às respetivas substâncias ativas ou vice-versa representou uma das minhas fragilidades experienciadas ao longo do estágio. Em contexto de atendimento, esta dificuldade, reforçada pelo facto de muito frequentemente os utentes se referirem à medicação pela sua denominação comercial, constituiu uma barreira à comunicação com o utente, uma vez que não podia esclarecer eventuais dúvidas ou até prestar o aconselhamento devido, sem primariamente associar o nome comercial com a denominação comum internacional, pela qual os medicamentos estão prescritos.

Neste aspeto, o programa Sifarma 2000[®] revelou grande utilidade, na medida em que permitia consultar rapidamente este tipo de informação.

- Receitas manuais

Atualmente, a maioria das receitas que surge na farmácia apresenta formato eletrónico (desmaterializadas/materializadas), no entanto ainda se verifica a prescrição de medicamentos pela via manual. Esta última tem carácter excepcional e apenas se pode realizar perante falência do sistema informático, inadaptação fundamentada do prescritor, prescrição ao domicílio ou por outras situações até um máximo de 40 receitas médicas por mês (6).

Foi neste tipo de receitas que senti dificuldade acrescida e no qual havia maior probabilidade de ocorrência de erros. Nas receitas manuais, o número de elementos a

conferir para atestar a sua autenticidade é maior (exceção que justifica a utilização da receita manual, modelo da receita, identificação do utente, entidade financeira responsável e número de beneficiário, assinatura do médico, data de prescrição, vinheta do médico, identificação do local de prescrição ou a respetiva vinheta, regras de prescrição, e se, aplicável referência ao regime especial de comparticipação) e para além disso é necessário verificar a existência de rasuras ou de caligrafias diferentes (7).

Durante o atendimento e na presença de receitas manuais, a minha atenção centrava-se sobretudo na conferência da receita, em vez de se focar no utente e no seu aconselhamento. É ainda importante referir que face às diferentes caligrafias que me iam surgindo, foi muitas vezes difícil perceber o que estava prescrito, havendo necessidade de recorrer à equipa técnica. Considero que esta situação resultou da minha inexperiência inicial, realidade esta que se foi debelando ao longo do estágio.

- Insegurança

Durante o estágio e, particularmente numa fase inicial do atendimento ao público, a reduzida experiência na realidade da FC traduziu-se em alguma insegurança, não pela repercussão a nível pessoal, mas pela consciência dos efeitos pejorativos que um erro poderia acarretar para a saúde e para o bem-estar do utente. O receio de prestar um aconselhamento errado levou a que, por vezes, me sentisse inibida no momento de dialogar com o utente. Porém, esta insegurança foi-se atenuando à medida que me ia familiarizando com o sistema informático e, conseqüentemente com as suas potencialidades, e também devido ao excelente clima de aprendizagem, compreensão e companheirismo proporcionado pela equipa técnica.

- Problemas de stock

Durante o período de estágio e, particularmente na fase de atendimento ao público, fui confrontada com problemas de *stock* relacionados com a ausência de determinados produtos ou pela não correspondência entre o *stock* informático e o *stock* real (erros de *stock*).

Quando um utente solicitava um produto que não estava disponível na farmácia, a minha postura para solucionar esta necessidade assentava na realização de uma encomenda instantânea e respetiva reserva, ou no caso de o produto não estar disponível no armazém, tentar encontrar numa outra farmácia da zona que o pudesse dispensar. Por vezes, face a esta indisponibilidade de produtos, os utentes demonstravam-se descontentes, não sendo fácil lidar com determinadas situações.

Por outro lado, os erros de *stock* originavam situações constrangedoras que espelhavam uma imagem de insegurança e de falta de assertividade nas informações que eram prestadas ao utente, com impacto negativo ao nível da imagem e confiança que devemos transmitir enquanto profissionais competentes. Além disso, quando o *stock* informático era superior ao que efetivamente estava disponível na farmácia, verificava-se um prolongamento do atendimento (tempo desperdiçado na procura de um produto que não se encontrava na farmácia) que nem sempre era bem compreendido por parte dos utentes.

1.2 Análise Externa

1.2.1 Oportunidades

- Formações

A par das formações internas, anteriormente referidas (nos pontos fortes), a FE proporcionou aos seus estagiários a oportunidade de participar em algumas formações promovidas por Laboratórios. Nessas mesmas formações foram abordadas as temáticas da asma, hipertensão e cuidados a ter com a pele, incluindo a proteção solar, sendo também apresentados os portefólios de produtos/dispositivos de cada Laboratório.

As formações permitiram a assimilação de conhecimentos acerca de novos produtos/dispositivos, permitindo assim um aconselhamento rigoroso e assertivo aos utentes.

- Noite de serviço

A FE, de forma periódica e intercalada com as restantes farmácias da região, apresenta-se sob serviço permanente, isto é, mantém-se em funcionamento, ininterruptamente, desde a hora de abertura até à hora de encerramento do dia seguinte.

Durante o estágio, foi-me proporcionada a oportunidade de experienciar um desses serviços, o que me permitiu compreender e assimilar toda a dinâmica dos atendimentos noturnos realizados através do postigo.

1.2.2 Ameaças

- Lacunas no Plano Curricular do MICF

Apesar do plano de estudos do MICF estar delineado para uma formação multidisciplinar e de já ter realizado um estágio de verão em FC, numa fase inicial do atendimento senti dificuldades em dar resposta às dúvidas, preocupações, dificuldades e

expetativas expressas pelos utentes, particularmente no que diz respeito aos produtos de dermocosmética, puericultura, higiene oral e de veterinária. Para além disso, ao longo do estágio surgiram inúmeras situações em que os utentes procuravam uma solução para problemas de saúde não graves, que podem ser resolvidos através de medicamentos de venda livre e com as quais não estava familiarizada, o que me levou a recorrer ao auxílio da equipa técnica da farmácia.

No sentido de colmatar algumas das lacunas acima descritas, considero que o MICF poderia proporcionar um ensino com uma vertente de carácter prático mais aprofundada e que, conseqüentemente espelhasse situações clínicas que podem decorrer durante o exercício profissional.

- (Des)Informação

Vivemos numa época em que a maioria da população tem acesso a uma grande diversidade de fontes de informação. Durante o estágio, esta situação foi bastante percecionada pelo facto de os utentes questionarem sobre vários produtos que, numa altura específica, estavam a ser publicitados nos meios de comunicação. Esta situação impôs da minha parte uma constante atualização para conseguir dar resposta às necessidades e às expetativas dos utentes. Por outro lado origina situações de utentes mal informados, que nem sempre foram fáceis de gerir. Nestas situações, é fundamental comunicar de forma assertiva e empática, transmitindo segurança na informação que se presta.

- Referência ao valor dos medicamentos

Nos guias de tratamento verifica-se, na maioria das vezes, referência ao valor que o utente tem a pagar pelo medicamento, à data da prescrição. No entanto, este valor nem sempre corresponde à realidade, uma vez que, tanto o preço dos medicamentos, como a percentagem de comparticipação sofrem periodicamente atualizações.

Quando o valor a pagar não correspondia ao valor mencionado no guia de tratamento, o utente mostrava-se descontente e, muitas vezes, tomava uma atitude de desconfiança, mais acentuada perante os estagiários. Nestas situações, justificava ao utente a diferença de valores encontrada.

2. Casos Clínicos

Caso Clínico 1

Utente do sexo feminino, com cerca de 45 anos, apresenta-se na farmácia com queixas de prurido, devido à presença de pequenas manchas avermelhadas que se estendem a várias zonas do corpo. Após algumas perguntas, a utente refere que o aparecimento dessas manchas terá coincido com a toma de um antibiótico.

Este facto aponta para uma possível reação alérgica ao medicamento, pelo que aconselhei à utente dirigir-se a uma consulta médica, tendo dispensado o creme Benaderma® (10 mg/g de difenidramina, 80 mg/g de calamina e 1 mg/g de cânfora), com propriedades antipruriginosas e calmantes, apenas para alívio dos sintomas.

Caso Clínico 2

Utente do sexo masculino, com cerca de 35 anos, dirige-se à farmácia, solicitando solução para uma unha do pé que apresentava sinais de descolamento, espessamento e destruição e ainda manchas brancas/amareladas.

Após observação da unha, confirmou-se que se tratava de um caso de onicomicose (infecção das unhas provocada por fungos). Dada a situação clínica, aconselhei a utilização do verniz antifúngico Locetar® (50 mg/ml de cloridrato de amorolfina), uma a duas vezes por semana, fornecendo todas as informações necessárias à sua correta aplicação (limar a unha utilizando a lima descartável, limpar a unha com a compressa embebida em álcool, aplicar o verniz na totalidade da superfície da unha afetada com a espátula e deixar secar). Para além disso, salientei a importância dos cuidados de higiene do pé (enxaguar diariamente o pé, se possível com um gel antisséptico, e secar com uma toalha que deve ser exclusiva do pé com onicomicose) e do arejamento ou limpeza do calçado. O utente foi ainda alertado para o facto de que o tratamento daquela infecção é normalmente longo e que os resultados demoram a surgir, sendo essencial a persistência do mesmo. Por último referi que, se aquela situação não apresentasse evolução favorável ou piorasse, por exemplo pelo aparecimento de dor, poderia recorrer às consultas de podologia que se realizam na farmácia aos sábados.

Caso Clínico 3

Utente do sexo feminino, com cerca de 50 anos, refere que está com uma forte diarreia e cólicas intestinais desde a tarde do dia anterior e solicita algo para resolver a situação.

Questionei o utente sobre a ocorrência de determinados sintomas, tais como febre e vômitos, sobre a presença de sangue nas fezes e se era portador de algum distúrbio gastrointestinal. Face às respostas negativas para as questões anteriormente indicadas, aconselhei a toma do antidiarreico Imodium Rapid® (2 mg de cloridrato de loperamida) que se apresenta sob a forma orodispersível (dissolver na boca, não havendo necessidade de ingestão de qualquer líquido) e que, deste modo conduz a um efeito mais imediato. Já que se tratava de uma diarreia aguda, a dose inicial seria de 2 comprimidos, seguidos de 1 comprimido após cada dejeção diarreica, não ultrapassando os 8 comprimidos ao dia. Para além disso, recomendei a toma de uma saqueta de um probiótico, designado UL-250® (250 mg de *Saccharomyces boulardii*), 3 vezes ao dia, de forma a repor a flora intestinal. Pelo facto de a utente apresentar cólicas intestinais, aconselhei ainda a toma de 1 a 2 comprimidos de Buscopam Compositum N® (10 mg de brometo de butilescopolamina e 500 mg de paracetamol), de 8 em 8 horas. Este medicamento apresenta propriedades espasmolítica e analgésica. Durante o atendimento, alertei para a importância das medidas não farmacológicas, tais como ingerir pequenas, mas frequentes quantidades de água, evitar os sumos, leite e derivados, verduras cruas e gorduras. No caso de persistência da diarreia ou aparecimento de outros sintomas, especificamente a febre, presença de sangue nas fezes ou vômitos, indiquei ao utente que deveria dirigir-se a outros serviços de saúde (centro de saúde ou mesmo urgência hospitalar).

Caso Clínico 4

Utente do sexo masculino, com cerca de 21 anos, queixa-se de ter o nariz “entupido” e “sempre a pingar”, de espirrar muitas vezes, de lacrimejar e de sentir irritação ao nível dos olhos e da garganta. Refere ainda que, no ano passado, aproximadamente na mesma altura, sentiu o mesmo tipo de sintomas.

Face ao sintomas apresentados pelo utente e, tendo em conta que a época do ano em que nos encontrávamos se caracteriza por elevada quantidade de pólen no ar, deduzi que se tratava de uma rinite alérgica sazonal. Perante esta situação, aconselhei a limpeza nasal diária com uma solução isotónica (Nasomar®) com o objetivo de remover os alérgenos aderidos à mucosa nasal. Para além disso, aconselhei as pastilhas Strepils® (1,2 mg de Álcool diclorobenzílico e 0,6 mg Amilmetacresol) com ação antisséptica, lubrificante e calmante, de modo a aliviar a irritação na garganta. No momento da cedência, indiquei ao utente que cada pastilha deve ser lentamente dissolvida na boca, a cada duas a três horas, conforme necessário. Dada a componente alérgica, recomendei a toma de um comprimido por dia, preferencialmente antes das refeições, de um anti-histamínico sistémico de terceira geração,

Telfast® (120 mg de cloridrato de fexofenadina), que não apresenta efeitos sedativos. Expliquei ao utente que este medicamento iria aliviar os sintomas associados à rinite alérgica (congestão nasal, rinorreia, olhos lacrimejantes e irritados) e que deveria ser tomado num período máximo de 7 dias. No caso da persistência ou até do agravamento dos sintomas, indiquei ao utente que deveria recorrer a uma consulta médica.

Considerações Finais

O estágio curricular em FC revelou-se como uma oportunidade imprescindível para conhecer a dinâmica, a organização e o funcionamento de uma área de intervenção farmacêutica, representando uma etapa de integração no exercício laboral.

Durante este período enfrentei uma grande diversidade de situações que contribuíram para o meu desenvolvimento enquanto pessoa e futura profissional. Por outro lado, apercebi-me de que o papel do farmacêutico vai muito além da cedência dos medicamentos, o que impõe a necessidade de atualização contínua dos conhecimentos técnico-científicos e a melhoria no domínio das relações interpessoais. É essencial adotar-se uma atitude pró-ativa e adaptada ao dinamismo deste sector, bem como ao consumidor cada vez mais informado.

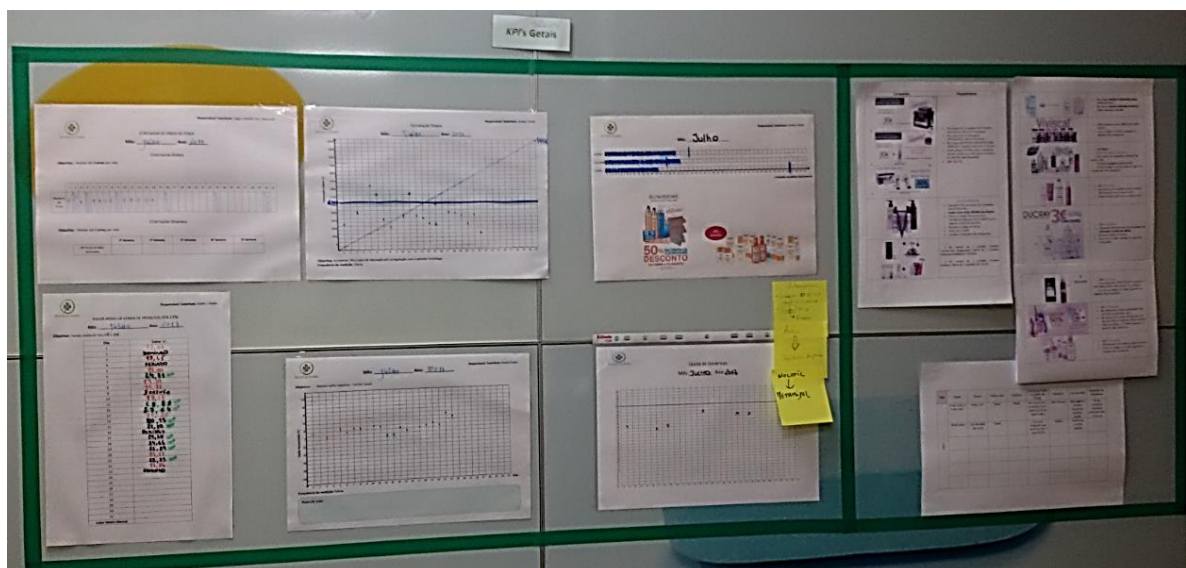
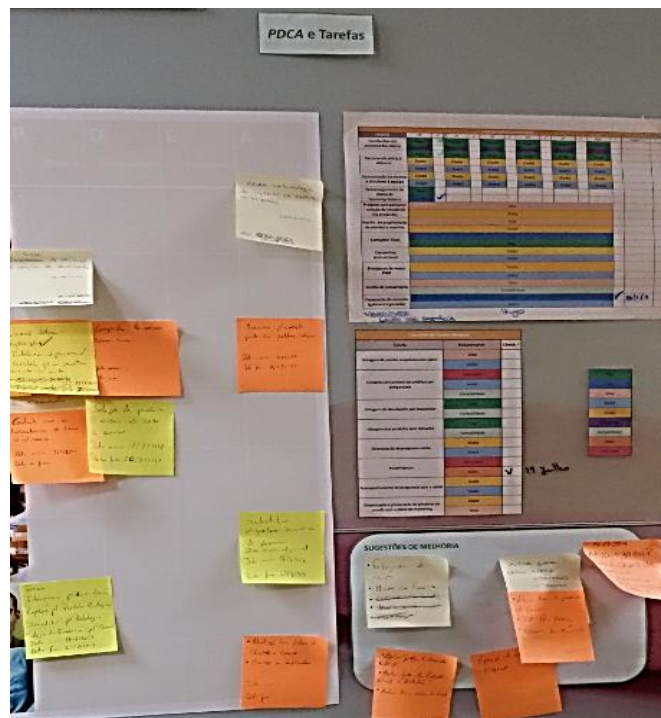
Finda esta etapa, dirijo um agradecimento a todos os que a tornaram possível. O meu Obrigado à Farmácia Estádio, especificamente à Dra. Ana Isabel Rebelo, minha orientadora de estágio, e a toda a equipa técnica (Dr. André Paiva, Dr. Luís Cavaleiro, Dra. Elodie Domingues, Dra. Mónica Gomes, Sra. Dina Rodrigues, Sra. Edite Dinis, Sr. Hugo Travassos, Dra. Maria João Domingues, Dra. Carolina Cordeiro e Dona Glória Silva) pelo acolhimento, disponibilidade e conhecimento transmitido ao longo desta etapa do meu percurso académico.

Referências Bibliográficas

- (1) Decreto-Lei nº 288/2001 de 10 de Novembro. Diário da República; Série I, Nº 261 (2001) 7150-7165
- (2) SANTOS, H., CUNHA, I., COELHO, P., CRUZ, P., BOTELHO, P., FARIA, G., MARQUES, C., GOMES, A. – **Boas Práticas Farmacêuticas para a farmácia comunitária (BPF)**. Conselho Nacional da Qualidade, 3ª edição, 2009. [Consultado a 27 de junho de 2017]. Disponível na Internet:
http://www.ordemfarmaceuticos.pt/xFiles/scContentDeployer_pt/docs/Doc3082.pdf
- (3) Instituto de Apoio às Pequenas e Médias Empresas e ao Investimento – **A análise SWOT**. [Consultado a 27 de fevereiro de 2017]. Disponível na Internet:
<https://www.iapmei.pt/getattachment/PRODUTOS-E-SERVICOS/Empreendedorismo-Inovacao/Empreendedorismo/Guias-praticos/A-analise-SWOT.pdf.aspx>
- (4) KAIZEN™ INSTITUTE – **O que é Kaizen?** [Consultado a 27 de junho de 2017]. Disponível na Internet: <https://pt.kaizen.com/quem-somos/significado-de-kaizen.html>
- (5) BARBOSA, C.M – **Manipulação Clínica - Dispensa clínica de medicamentos manipulados**. Boletim do CIM - Revista da Ordem dos Farmacêuticos. Vol. 88, (2009), 1-4. [Consultado a 3 de julho de 2017]. Disponível na Internet:
http://www.ordemfarmaceuticos.pt/xFiles/scContentDeployer_pt/docs/doc6263.pdf
- (6) Portaria nº 224/2015 de 27 de julho. Diário da República; Série I, Nº 144 (2015) 5037-5043
- (7) INFARMED – **Normas relativas à prescrição de medicamentos e produtos de saúde**. [Consultado a 3 de julho de 2017]. Disponível na Internet:
http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/Normas_Prescri%C3%A7%C3%A3o_20151029.pdf/bcd0b378-3b00-4ee0-9104-28d0db0b7872

Anexos


Anexo I | Quadro Kaizen



Anexo 2 | Ficha de Preparação de um medicamento manipulado

FARMÁCIA ESTÁDIO
Dr. Ana Isabel da Silva C. N. Oliveira Pinheiro
 C.º de Farmácia nº 503 685 94
 Tel.º: 239 152 996
 Rua D. João III, Nº 11 - 3050-349 COIMBRA

Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados



Medicamento: Vaselina com enofre a 6%

Teor em Substância(s) activa(s): 100g (ml ou unidades) contém 6 g (ml) de Enofre

Forma Farmacéutica: Pomada Data de Preparação: 14/06/2017

Número do Lote: 17169 e 17170 Quantidade a Preparar: 1000g

Matérias Primas	N.º do Lote	Origem	Farmacopéia	Quantidade para 100g(ou mL ou unid)	Quantidade Calculada	Quantidade Pesada	Operador	Supervisor
Enofre	151131	Acofarm	Ph. Eur. B	6g	60g	60g	AP 14/06/2017	AP 14/06/2017
Vaselina Sólida	161740	Acofarm	Ph. Eur. B	50g	500g	500g		
Vaselina Líquida	160659	Acofarm	Ph. Eur. B	q. b. p. 100g	440g	440g		

Preparação	Rubrica do Operador
1. Pesar as matérias-primas.	AP
2. Adicionar o enofre à vaselina sólida em recipiente Unguato. Prefurar com vaselina líquida.	
3. Misturar com Unguato a 1000 durante um minuto aumentando a velocidade durante cerca de 30 segundos.	
4. Rotular.	
5.	
6.	
7.	
8.	

ATD-IMP-10-01

Embalagem

Tipo de Embalagem: Recipiente Unguato

Capacidade do Recipiente: 1000 - 1273

Material de Embalagem	N. do Lote	Origem

Operador: AP

Prazo de utilização e condições de conservação

Condições de conservação: Conservar bem fechado ao abrigo da luz e em local fresco e seco

Prazo de utilização: 2 meses Operador: AP

Verificação

ENSAIO	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADO	RUBRICA OPERADOR
Homogeneidade	Homógeneo	✓	AP

Aprovado Rejeitado

Supervisor: AP Data: 14/06/2017

Nome, morada e telefone do doente

Nome do prescriptor

Anotações

ATD-IMP-10-01

Rubrica do Director Técnico	Data
<u>[Assinatura]</u>	<u>14.06.2017</u>

Calculo do preço de venda

Materiais - Primas:

Materiais Primas	Embalagem existente em armazem		Preço de aquisição de uma dada quant. unit. (g/vas)		Quantidade a usar	factor multiplicativo	Preço da Matéria Prima utilizada na preparação
	Quantidade adquirida (g/ml)	Preço de aquisição (€/va)	Quantidade unitária (g/ml)	preço			
Enxofre	1000		1		60 dc.	1,9	
Vaselina Sólida	1000		1		500 hc.	1,6	
Vaselina Líquida	1000		1		440 hc.	1,5	
					#%/D		
					#%/D		
					#%/D		
Subtotal A							

Honorários de Manipulação:

Forma Farmacéutica	Quantidade (g/ml)	FEI	Factor Multiplicativo	Valor
suspensão	100		4,5	
Valor adicional	900		0,005	
Quantidade Total Manipulada				1000
Subtotal B				

Material de Embalagem:

Material de Embalagem	Preço de aquisição (€/VA)	Quantidade	Factor Multiplicativo	Valor
Recipiente Unguário 1000 - 1273		1	1,2	
Subtotal C				

PREÇO DE VENDA AO PÚBLICO DO MEDICAMENTO MANIPULADO: (A+B+C) IVA

D

Dispositivos Auxiliares de Administração:

Dispositivos	Preço unitário	Quantidade	Valor
			0,00 €
			€ 0,00 €

PREÇO FINAL: D + I

OPERADOR: *[Assinatura]* SUPERVISOR: *[Assinatura]*

ATD-IMP-10-01

Rubrica do Director Técnico	Data

Anexo 3 | Rótulo de um medicamento manipulado

	
Farmácia Estádio	
Dir. Téc. Ana Isabel da Silva C. N. Oliveira Rebelo Rua D. João III, n.º 11 * 3030-349 Coimbra Telef239792470 * Fax239792471	
Lote: 17169 a 17170	Data: 14/06/2017
Preço: <input type="text"/>	
Doente: <input type="text"/>	
Médico: <input type="text"/>	
Enxofre	6g
Vaselina Sólida	50g
Vaselina Líquida q.b.p.	100g
Uso Externo. Aplicação Cutânea. Manter afastado do alcance das crianças. Guardar bem fechado em local seco e fresco. Prazo de Utilização: 2 meses	
ATD-IMP-11-01	

Parte II: Relatório em Indústria Farmacêutica



Farmalabor

Orientadora: Engenheira Maria Eugénia Amaral

Abreviaturas

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

GQ – Garantia de Qualidade

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

SGQ – Sistema de Gestão de Qualidade

Introdução

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), lecionado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por um período de cinco anos, está delineado para a formação teórica, prática e multidisciplinar dos seus alunos, conferindo-lhes competências transversais e específicas e ainda aptidões técnico-científicas para as várias áreas de intervenção farmacêutica.

No final da formação teórica e prática, o curso proporciona a realização de um estágio curricular que, para além de apresentar carácter obrigatório na formação do farmacêutico, representa uma importante oportunidade de integração no exercício profissional.

Face ao meu interesse para as disciplinas de Assuntos Regulamentares do Medicamento, Garantia de Qualidade e Tecnologia Farmacêutica e tendo em conta que o conteúdo do ato farmacêutico integra atividades de registo, fabrico e controlo dos medicamentos de uso humano e veterinário e dos dispositivos médicos, optei pela realização de um estágio em indústria farmacêutica, designadamente no departamento da Garantia de Qualidade (GQ) (1).

O presente relatório visa efetuar uma exposição e análise crítica do estágio realizado no período de 9 de janeiro a 31 de março de 2017 na Farmalabor, sob orientação da Engenheira Maria Eugénia Amaral e coorientação da restante equipa do departamento da GQ, através de uma análise SWOT, procurando respeitar a confidencialidade e o sigilo adequado a uma empresa desta natureza.

A análise SWOT consiste numa ferramenta de diagnóstico e planeamento estratégico de uma empresa, no entanto devido ao seu reduzido grau de complexidade, pode aplicar-se a outro tipo de análises, especificamente à análise de todas as atividades desenvolvidas no âmbito do estágio curricular. Esta análise é efetuada tanto a nível interno, no qual se identificam os Pontos Fortes (*Strengths*) e os Pontos Fracos (*Weaknesses*), como a nível externo, no qual se detetam as Oportunidades (*Opportunities*) e as Ameaças (*Threats*) (2).

Grupo Medinfar – Farmalabor

*“Assim como no passado, hoje e futuro...
A Saúde continuará a ser o nosso compromisso!”*

O grupo farmacêutico MEDINFAR, de capital 100% português, foi fundado no ano de 1970. É especializado em Investigação e Desenvolvimento, Fabrico de produtos farmacêuticos, cosméticos e suplementos, Distribuição, Marketing e Vendas. Para além das suas marcas próprias, fabrica e comercializa produtos autorizados em corporação com várias das indústrias farmacêuticas mundiais (3).

A sua política visa a otimização contínua dos produtos e serviços, tendo como base a satisfação das necessidades e requisitos dos clientes, bem como o seu compromisso para com a sociedade em geral.

Ao desenvolver Sistemas de Gestão de Recursos Humanos e investindo de forma contínua na formação de todos os seus colaboradores, o Grupo tem como finalidade construir um alicerce de natureza humana alinhado com as exigências e necessidades do negócio, adquirindo, assim, “valor através das Pessoas” (4).

De entre as várias unidades de negócio do Grupo, inclui-se a unidade industrial na qual decorreu o meu estágio curricular – a Farmalabor (3).

A Farmalabor, empresa nacional localizada na zona industrial de Condeixa-a-Nova e inserida no Grupo Medinfar desde 2001, dedica-se ao fabrico de produtos farmacêuticos não estéreis, cosméticos e suplementos por contrato (*contract manufacturing*).

Provida de tecnologia altamente especializada, certificada pelas normas ISO 9001 (Qualidade), ISO 14001 (Ambiente) e OHSAS 18001 (Saúde e Segurança do trabalho) e considerando as Boas Práticas de fabrico, a Farmalabor revela-se como um fabricante competitivo que garante a máxima eficiência, flexibilidade, melhoria contínua e qualidade em todos os serviços que presta (Anexo 1) (5).

Para um adequado funcionamento, a Farmalabor é dotada de uma estrutura organizacional bem vincada que define as funções e as responsabilidades de cada colaborador (Anexo 2). Embora esta unidade industrial apresente uma divisão em setores que efetuam o seu trabalho de forma autónoma e independente, estes estão em contínua interação. O trabalho em equipa permite a disponibilização de produtos/serviços de máxima qualidade e confiança, centrando-se na satisfação de clientes, colaboradores, acionistas e da própria sociedade.

I. Análise SWOT

I.1 Análise Interna

I.1.1 Pontos Fortes

- Estágio no Departamento da GQ

Face à necessidade de competir num meio cada vez mais globalizado e ao aumento dos custos de produção, a política da Indústria Farmacêutica deve procurar estabelecer um clima de confiança, assegurando elevados níveis de segurança, eficácia e qualidade. O não cumprimento destes requisitos traduz-se em risco para a saúde pública e desperdício de recursos, afetando seriamente a reputação da marca.

Entendendo a Qualidade como condição *sine qua non* para a diferenciação das competências e dos produtos de uma organização e para a sua afirmação no mercado, empresas como a Farmalabor, dotaram-se de um Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ). O mesmo inclui uma abordagem sistemática de todas as atividades que influenciam a qualidade, todas as intervenções que visam a prevenção do erro e a evidência objetiva e contínua de que a qualidade é garantida ao longo de todo o ciclo do medicamento (6).

Um SGQ capaz de se adaptar rapidamente a um contexto em permanente mudança, de fornecer produtos e serviços em conformidade com os requisitos do cliente e de aumentar a satisfação do cliente através da implementação eficaz do sistema, é indubitavelmente preponderante no desempenho competitivo da organização. Tal deve-se ao facto do SGQ promover melhor sistematização interna, maior confiança para os clientes, administração e colaboradores, maior transparência na tomada de decisões, redução da variabilidade nos produtos, diminuição dos custos associados a falhas e reclamações, maior credibilidade externa, acesso a novos mercados e cumprimento dos requisitos legais. Para assegurar o sucesso de um SGQ é essencial que toda a informação esteja documentada (6).

O SGQ é deste modo transversal a todas as atividades desenvolvidas na Farmalabor, que possam direta ou indiretamente influenciar a qualidade dos produtos, sendo que a GQ é responsável por muitas das atividades inerentes a este sistema (controlo de alterações, controlo de desvios e não conformidades, validação dos processos de fabrico, validação de higienizações, validação e qualificação dos sistemas informáticos, validação, qualificação e calibração dos equipamentos, qualificação das instalações, gestão de risco, qualificação dos fornecedores, revisão da qualidade do produto, gestão de documentos e registos). O carácter transversal e multidisciplinar deste departamento permitiu-me contactar com as diferentes

vertentes do ciclo do medicamento e compreender a dinâmica da unidade industrial, o que se revelou de extrema importância para a minha aprendizagem.

- Equipa

A unidade industrial Farmalabor apresenta uma estrutura organizacional bem definida, composta por profissionais especializados em diferentes atividades e que estão dispostos a integrar, formar e apoiar novos membros.

De facto, toda a organização e, particularmente a Equipa da GQ, contribuiu para a minha formação, possibilitando-me adquirir e sistematizar conhecimentos e desenvolver competências nas mais diversas áreas, nomeadamente a comunicação, a autonomia, a responsabilidade e a capacidade de análise crítica e de resolução de problemas. Demonstraram-me igualmente a importância do trabalho em equipa e a necessidade da atualização contínua de conhecimentos.

A equipa da GQ foi fundamental para que o estágio se tornasse numa experiência enriquecedora tanto a nível técnico-científico, como a nível humano, uma vez que sempre evidenciou disponibilidade para me elucidar acerca das várias temáticas e esclarecer qualquer dúvida, permitindo-me a autonomia para a realização das diferentes tarefas.

- Formação contínua e acesso a documentação interna

Com a finalidade de conceber uma rede de natureza humana alinhada com a estratégia da empresa e objetivos futuros, a Farmalabor investe fortemente na formação inicial e contínua de todos os seus colaboradores.

Assim, o primeiro dia de estágio iniciou-se por uma breve exposição acerca do Grupo Medifar e da Farmalabor, pela apresentação da equipa da GQ e enquadramento nas atividades deste departamento (GQ, Higiene e Segurança Industrial, Gestão Ambiental, Metrologia e Qualificação dos equipamentos e Sistemas de Suporte) e pelas formações no âmbito do Ambiente (informação referente à política ambiental, gestão de resíduos, tratamento de efluentes e contenção de derrames) e da Higiene e Segurança no trabalho (equipamentos de proteção individual, ficha de higiene e segurança industrial, regulamentação própria da unidade industrial e plano de segurança interno). Para além disso, ao longo do estágio usufruí do acesso a documentação interna da empresa e, respeitando sempre o sigilo profissional, efetuei uma leitura e análise crítica de procedimentos transversais e outro tipo de documentos emitidos pela GQ (Anexo 3). A leitura pormenorizada da documentação, seguida de formação referente às atividades do Sistema de Qualidade, proporcionada pelos responsáveis de cada uma delas, revelou-se uma mais-valia para a compreensão das mesmas e conseqüentemente para a minha aprendizagem.

- Contacto com outras áreas da unidade industrial

De uma forma geral, o estágio desenrolou-se no Departamento da GQ, no entanto e, já que este departamento é transversal às diferentes atividades realizadas na indústria, foi-me possível assistir a vários processos no Armazém e na Produção, sendo que nesta última tive a oportunidade de visitar as Secções das formulações sólidas, das formulações líquidas e pastosas e de embalagem. O acompanhamento das várias atividades permitiu-me compreender de forma detalhada, não somente o papel e as responsabilidades desempenhadas por cada um dos setores/colaboradores, como também a interação e cooperação entre os mesmos.

No Armazém pude verificar como se processa a receção, a amostragem, o armazenamento e a distribuição à produção de matérias-primas e materiais de acondicionamento e, no sentido oposto, a transferência do produto acabado da Secção de embalagem para o Armazém, para que o mesmo possa ser expedido.

Relativamente à Secção das formulações sólidas, assisti a processos de mistura, granulação, secagem, compressão, revestimento e enchimento de cápsulas com *pellets* e ainda me foi elucidado o modo de funcionamento dos equipamentos que levam a cabo os respetivos processos pelo responsável da área e pelo colaborador afeto à atividade. Para além disso, tive a possibilidade de acompanhar validações de processos de fabrico de novos produtos.

Já na Secção das formulações líquidas e pastosas, presenciei a preparação de cremes em dois equipamentos distintos, o enchimento de bisnagas, de frascos e de ampolas bebíveis e também me foi explicado o funcionamento dos respetivos equipamentos.

Quer na Secção das formulações sólidas, quer na Secção das formulações líquidas e pastosas pude verificar como decorrem os controlos em processo e a sua periodicidade.

- Autonomia e Contributo pessoal

O facto de me ter sido facultado um computador e um local de trabalho com vista a desempenhar as tarefas que me iam sendo propostas, contribuiu de forma positiva para o aperfeiçoamento e desenvolvimento de determinadas competências, especificamente, a autonomia, a organização, a responsabilidade e a capacidade de resolução de problemas.

No que diz respeito às atividades por mim desempenhadas no departamento da GQ são de indicar:

- Ajuda na elaboração e revisão de Instruções de Fabrico, Instruções de Acondicionamento e Instruções de Embalagem;

- Desenvolvimento de uma metodologia de implementação de “ICH guideline Q3D on elemental impurities”, verificação do *status* de fabricantes/fornecedores de matérias-primas e materiais de acondicionamento quanto ao envio de informação relativa a esta *guideline*, continuação da construção de uma folha de cálculo Microsoft Excel[®] que visa a reunião de dados das impurezas elementares de cada material e equipamento e o preenchimento da mesma.
- Cálculo do *Permitted Daily Exposure* para determinadas substâncias ativas utilizadas na unidade industrial, recorrendo, para isso, à pesquisa de estudos clínicos em bases de dados (TOXnet e Pubmed) e à conceção de uma folha de cálculo Microsoft Excel[®], na qual colocava todos os dados necessários ao respetivo cálculo e ainda informação toxicológica adicional que recolhia da Ficha de Dados de Segurança.
- Agregação e análise de dados úteis à investigação de diferentes desvios e ajuda na redação de um relatório referente a um desvio específico.
- Análise, resumo e recolha de informação de diversos artigos relativos aos limites de higienização que devem ser rejeitados e aos que devem ser aplicados, com vista à sua integração no procedimento de validação de higienização.
- Consulta de documentação de autorização de introdução no mercado (AIM), com a finalidade de cooperar no levantamento de dados de produtos afetados por um controlo de alterações e na elaboração de uma memória descritiva referente ao mesmo.
Oportunidade de integrar uma reunião que tinha como propósito o controlo de alterações acima mencionado e posterior ajuda na execução da respetiva ata e na revisão do plano de acompanhamento.
Recolha de dados úteis ao controlo de alterações em Registos de Lote.
- Construção de um fluxograma inerente a um processo específico.

- Trabalhar com ferramentas informáticas

Atualmente, a aptidão para ferramentas informáticas, particularmente para o sistema operativo Microsoft Windows[®] corresponde a uma competência inerente a várias áreas do exercício profissional, nas quais está incluída a indústria farmacêutica.

Durante o estágio, tive oportunidade de aperfeiçoar a minha destreza neste sistema operativo, visto que para efetuar as atividades que me iam sendo solicitadas, recorria ao processador de texto Microsoft Word[®], à folha de cálculo Microsoft Excel[®] e à Internet.

Outra ferramenta informática com a qual eu pude contactar diariamente, já que me foi criado um *email* interno, foi o Microsoft Outlook[®], que é utilizado como via de comunicação interna e externa.

- Língua inglesa

A crescente globalização e a conseqüente necessidade de uma língua de comunicação comum conduziu a que o inglês se tornasse a língua da ciência, da tecnologia e da comunicação internacional.

Ao estagiar numa unidade industrial pertencente a um Grupo cuja estratégia assenta também na internacionalização, fui confrontada muitas vezes com documentação em inglês. Este facto, junto com a tradução de alguns documentos para inglês, sustentou o meu desenvolvimento e aperfeiçoamento nesta língua, alargando o vocabulário relativamente a termos técnicos inerentes à linguagem da indústria farmacêutica.

- Inovação tecnológica

A estratégia interna de inovação tecnológica aplicada a novos processos e produtos ou ao melhoramento dos que já existem, tornam a Farmalabor um fabricante provido de tecnologias altamente especializadas e, conseqüentemente, moderno, dinâmico e altamente competitivo, tanto a nível nacional como internacional (5).

Este facto apresenta-se incontestavelmente como uma mais-valia para a minha formação, pois fomentou o espírito de atualização contínua e de iniciativa/criatividade e permitiu-me conhecer as novas tecnologias utilizadas pela indústria farmacêutica.

1.1.2 Pontos Fracos

- Défice de conhecimento em áreas específicas e dificuldade em integrar todo o conhecimento associado à GQ

Ao estar associada a todo o ciclo do medicamento, a GQ é transversal às várias atividades desenvolvidas na unidade industrial e, portanto, funciona em estreita colaboração com todos os outros departamentos. Embora este facto represente um ponto forte para a minha formação, na medida em que contactei com diferentes áreas de atuação, denotei alguma dificuldade em assimilar toda a informação num curto espaço de tempo.

A Indústria Farmacêutica apresenta-se como um dos setores de atividade mais regulamentados do mercado, sendo inúmeras as normas, orientações e requisitos a que está sujeita. Embora o plano de estudos inclua matéria de carácter regulamentar, o facto de constantemente ter que me recordar e colocar em prática toda essa matéria, representou uma adversidade ao meu estágio.

- Tempo de estágio

A duração do estágio traduziu-se indubitavelmente num fator limitante para esta experiência. Os dois meses de aprendizagem, embora se revelassem muito enriquecedores quer a nível técnico-científico, quer a nível humano, não me permitiram apreender, de forma completa e aprofundada, o funcionamento, a gestão e a organização de uma empresa desta natureza. É igualmente importante referir que, este curto período de estágio, não me possibilitou acompanhar até ao fim alguns dos projetos em que fui incluída, designadamente a investigação de determinados desvios e controlo de alterações.

1.2 Análise Externa

1.2.1 Oportunidades

- Contacto com “outra” realidade profissional das Ciências Farmacêuticas

Embora o conteúdo do ato farmacêutico integre diferentes áreas do exercício profissional, o farmacêutico sempre se encontrou maioritariamente alocado à farmácia comunitária (1,7). Porém, nos tempos de hoje caracterizados pela dificuldade de acesso ao mercado de trabalho, os jovens farmacêuticos apostam cada vez mais em novas áreas de atividade, no âmbito da indústria farmacêutica, distribuição grossista, análises clínicas, hidrologia, bromatologia, ensaios clínicos, assuntos regulamentares, ensino, entre outros (8).

De modo a ajustar-me aos novos desafios e oportunidades da profissão e, já que sempre me senti motivada e interessada pela área, optei também pelo estágio na indústria farmacêutica. Este estágio, ao promover o contacto com o meio profissional, permitiu-me relembrar e aplicar matérias teórico-práticas lecionadas durante o curso, adquirir novos conhecimentos, compreender a dinâmica de trabalho numa indústria e ainda desenvolver competências técnicas, científicas e humanas necessárias para o futuro.

- Plano de estudos do MICE

O facto de o plano curricular do MICE incorporar as disciplinas de GQ e de Assuntos Regulamentares do Medicamento é por vezes subestimado pelo seu carácter essencialmente teórico. No entanto, foi quando iniciei o estágio em indústria que percecionei a verdadeira importância dos conhecimentos adquiridos nestas duas disciplinas. Todas as atividades efetuadas na indústria são regulamentadas e o conhecimento prévio das Boas Práticas de Fabrico, de normas e requisitos aplicáveis à indústria, bem como do *Common Technical Document* e das alterações de AIM, representou um suporte importante para o desempenhar das várias tarefas que me iam sendo solicitadas. Foi igualmente

importante a formação na área das Tecnologias Farmacêuticas, uma vez que a GQ se apresenta em estreita cooperação com a área de Produção (investigação de desvios, validação de processos de fabrico, controlo de alterações, revisão da qualidade do produto, entre outras).

I.2.2 Ameaças

- Primeiro contacto com a indústria farmacêutica

Já que se tratava do meu primeiro estágio em indústria farmacêutica, é crucial evidenciar a minha completa inexperiência nas situações com que me deparava e no tipo de atividades que me iam sendo propostas. Para além disso, o ritmo de trabalho que encontrei na unidade industrial, caracterizado por horários altamente regulados (pausas e horas de almoço, de entrada e de saída), era bastante diferente daqueles que já tinha experienciado em alguns estágios.

Todos os fatores anteriormente enunciados, se por um lado representaram uma oportunidade de aprendizagem e até de adaptação, por outro constituíram uma ameaça ao meu estágio na medida em que não tinha competências e conhecimentos prévios inerentes a esta realidade profissional.

Considerações Finais

A possibilidade de realizar o estágio na Farmalabor tornou-se num momento importante do meu percurso académico, visto que após vários anos de contacto com a componente teórica, surgiu a oportunidade de experienciar um dos possíveis contextos para o exercício profissional.

Durante esta etapa curricular tive a possibilidade de assimilar vários conteúdos teóricos anteriormente lecionados, adquirir novos conhecimentos e desenvolver um conjunto de competências que serão preciosas ferramentas para o meu futuro profissional.

Ainda neste estágio pude perceber que o farmacêutico, enquanto elemento da equipa multidisciplinar, contribui indubitavelmente para dar uma resposta efetiva aos constantes desafios que se colocam à Indústria Farmacêutica, acrescentando assim valor ao setor.

Finda esta etapa, dirijo um agradecimento a todos os que a tornaram possível. O meu Obrigado ao Grupo Medinfar, especificamente à Farmalabor e a todos os seus colaboradores pelo seu acolhimento e participação neste período de aprendizagem, particularmente à Eng.ª Maria Eugénia Amaral, minha orientadora de estágio, e a toda a equipa do departamento da Garantia de Qualidade (Eng.ª Áurea Ferreira, Dra. Isabel Viegas, Dr. João Braga, Dra. Patrícia Fonseca, Dra. Paula Alírio e Dra. Rita Leão).

Referências Bibliográficas

- (1) Decreto-Lei nº 288/2001 de 10 de Novembro. Diário da República; Série I, N° 261 (2001) 7150-7165
- (2) Instituto de Apoio às Pequenas e Médias Empresas e ao Investimento – **A análise SWOT**. [Consultado a 27 de fevereiro de 2017]. Disponível na Internet: <https://www.iapmei.pt/getattachment/PRODUTOS-E-SERVICOS/Empreendedorismo-Inovacao/Empreendedorismo/Guias-praticos/A-analise-SWOT.pdf.aspx>
- (3) MEDINFAR – **O Grupo**. [Acedido a 28 de fevereiro de 2017]. Disponível na Internet: <http://www.medinfar.pt/o-grupo/>
- (4) MEDINFAR – **Compromisso com as pessoas**. [Acedido a 28 de fevereiro de 2017]. Disponível na Internet: <http://www.medinfar.pt/trabalhar-na-medinfar/>
- (5) MEDINFAR – **FARMALABOR**. [Acedido a 28 de fevereiro de 2017]. Disponível na Internet: <http://www.medinfar.pt/farmalabor/>
- (6) INSTITUTO PORTUGUÊS DA QUALIDADE – **Norma Portuguesa - Sistema de gestão da qualidade. Requisitos (ISO 9001:2008)**. 3ª edição, 2008. [Consultado a 3 de março de 2017]. Disponível na internet: https://www.mar.mil.br/cpce/Arquivos/ISO_9001-2008.pdf
- (7) ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **Distribuição por área de exercício**. [Acedido a 6 de março de 2017]. Disponível na internet: www.rroteirosfarmaceuticos.pt/pt/indicadores/distribuicao-por-area-de-exercicio/
- (8) ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **Jovens farmacêuticos debateram futuro da profissão**. [Acedido a 6 de março de 2017]. Disponível na internet: http://www.ordemfarmaceuticos.pt/scid/ofWebInst_09/defaultArticleViewOne.asp?articleID=6772&categoryID=1492

Anexos

Anexo I | Serviços prestados pela Farmalabor

Fabrico e Acondicionamento de produtos não estéreis

- Formulações Sólidas - Comprimidos, Comprimidos revestidos, Cápsulas, Pellets e Saquetas com pó/granulado
- Formulações Líquidas - Soluções, Suspensões e Xaropes
- Formulações Pastosas - Cremes, Geles e Supositórios

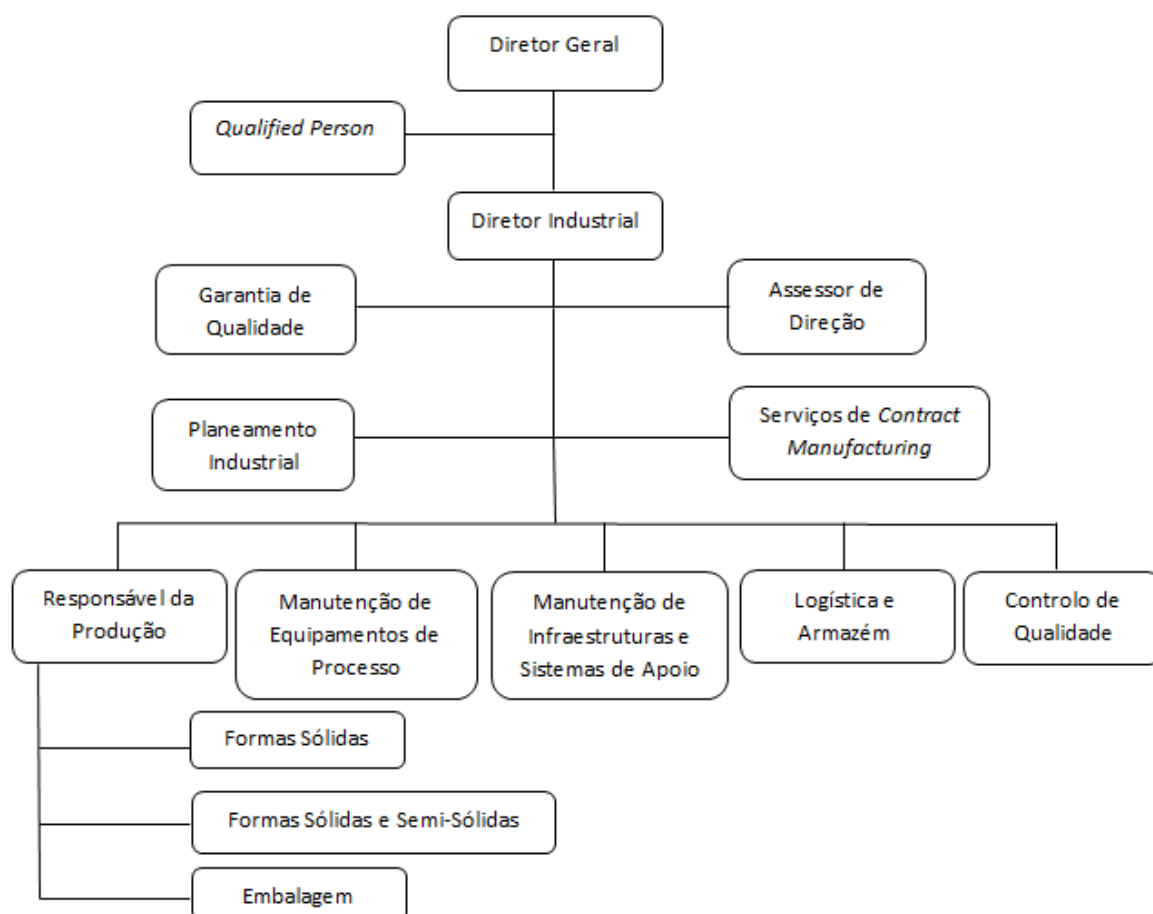
Controlo de Qualidade

- Estudos de estabilidade *On Going*
- Serviços analíticos vários

Outros serviços

- Libertação de lotes para a UE
- Apoio Regulamentar
- Fabrico de lotes de validação
- Validação de processos de fabrico

Anexo 2 | Estrutura Organizacional da Farmalabor



Anexo 3 | Documentação

- Regras de acesso, conduta e circulação: Documento que descreve as normas gerais de acesso às instalações da Farmalabor, das regras de conduta e higiene pessoal e do modo de circulação de pessoas.
- Manual da instalação fabril: Documento que contempla informações que dizem respeito à unidade industrial, especificamente, atividades de fabrico autorizadas, SGQ (política, missão e responsabilidades), procedimento de libertação do produto acabado, gestão de fornecedores e contratos, gestão da análise de risco, revisão da qualidade do produto, pessoal, instalações e equipamentos, documentação, produção, controlo de qualidade, autoinspeções e distribuição, reclamações e recolha de produtos.
- Receção, Armazenamento/Distribuição à Produção: Documento que determina as etapas a seguir no controlo da receção e armazenamento, de modo a que se possa proceder sistemática e uniformemente aquando da chegada dos materiais ao Armazém. Apresenta ainda orientações relativas à distribuição dos materiais aprovados à Produção.
- Elaboração e Preenchimento de um Registo de Lote: O Registo de Lote corresponde ao histórico do fabrico/acondicionamento de cada lote de produto, englobando a descrição de toda a informação relevante para a qualidade do produto final e para uma eficiente rastreabilidade. Inclui as Instruções de Pesagem, de Fabrico e de Acondicionamento (Acondicionamento Primário e Acondicionamento Secundário/Embalagem). Neste âmbito, a elaboração, impressão e distribuição da Instrução de Fabrico/Acondicionamento fica a cargo da GQ.
- Procedimento Geral de Validação dos processos de fabrico: A validação de um processo de fabrico atesta, com elevado grau de segurança, que um processo específico produz de forma eficiente e reprodutível um produto que se encontra em conformidade com as especificações pré-determinadas e atributos de qualidade.

Assim, com vista à validação de um processo de fabrico, torna-se imperativo conceber um protocolo de validação (GQ), no qual se estabelece o modo como a mesma irá ser orientada, desde parâmetros críticos a testar, características do produto, equipamentos e produção e ainda especificações a que deverão obedecer os resultados.

Neste procedimento são mencionados dois tipos de validação, nomeadamente a validação prospetiva, realizada antes da libertação de qualquer lote para o mercado (nova entidade química ou novo produto para a unidade industrial) e que exige aprovação pelo INFARMED e a validação concorrente/concomitante, que decorre em simultâneo com a libertação do produto para o mercado e que não requer aprovação pelo INFARMED na medida em que comporta alterações menores do tipo *to tell to do*.

Sempre que ocorrem alterações ao processo de fabrico/produto ou a validação tenha sido efetuada há 5 anos, então tem de se executar uma revalidação, de forma a atestar que alterações relacionadas com o processo ou com o produto não influenciam negativamente as características do processo e a qualidade do produto.

- Procedimento Geral de Validação de Higienização: A validação de higienização dos equipamentos (que entram em contacto direto com o produto) assegura a eficácia e a reprodutibilidade da higienização, de forma a diminuir os riscos de contaminação em produtos subsequentes, quer a nível microbiológico, quer de resíduos de substância ativa e agentes de limpeza e a garantir a qualidade dos produtos farmacêuticos. O resultado conforme referente a três amostragens, permite afirmar que efetivamente a higienização está a evitar a contaminação dos produtos.

O referido procedimento define agentes de limpeza e desinfetantes a utilizar, as respetivas concentrações e frequências de utilização e ainda os tempos de espera do equipamento limpo e sujo.

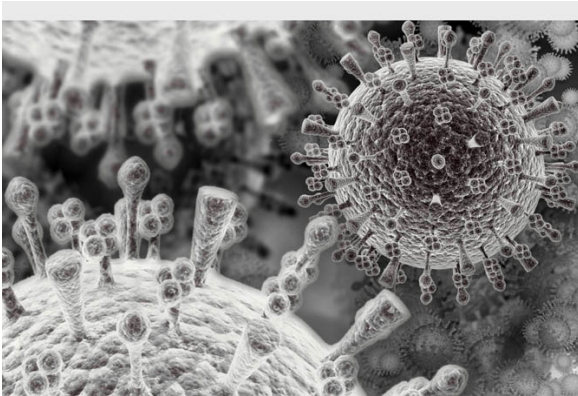
- Controlo de alterações: numa empresa movida pela melhoria contínua, o aparecimento de propostas de alterações consiste em algo que é comum e imprescindível, porém é imperativo garantir a adequação das instalações e equipamentos, a reprodutibilidade dos processos, a qualidade do produto farmacêutico e a conformidade com os documentos submetidos pelo titular de AIM. Por conseguinte, a avaliação do impacto das alterações ao nível da qualidade do produto, *compliance* regulamentar e eficiência dos processos e a definição e acompanhamento de ações necessárias à alteração ficam a cargo da GQ.
- Procedimento Geral de desvios: Qualquer desvio, ocorrência/falha não planeada no cumprimento das *Good Manufacturing Practices* e da norma ISO 9000 que ocorre antes da libertação do lote, requer o seu registo, investigação e tratamento. Após identificação da causa raiz do desvio, a GQ avalia o impacto da mesma na qualidade do produto, determina as ações preventivas e/ou corretivas a serem tomadas e monitoriza a eficácia dessas ações, ou seja, verifica se no decurso de um ano houve recorrência do mesmo tipo de desvio.
- Gestão e Qualificação de Fabricantes de matérias-primas e de materiais de acondicionamento: A gestão e qualificação de fabricantes permitem o desenvolvimento de uma lista completa de todos os materiais (matérias-primas e materiais de acondicionamento) utilizados e respetiva avaliação dos fabricantes - Listagem de Avaliação Contínua. Esta lista permite verificar as GMP dos fabricantes, atualizar os planos de auditorias aos fornecedores/fabricantes e ainda atenuar os custos de processamento (redução de amostragens e de análises aos materiais). Nesta atividade, a GQ tem a

responsabilidade de assegurar que os fabricantes de materiais que possam influenciar direta ou indiretamente a qualidade, segurança e eficácia dos produtos são dotados de competência técnica para se encontrarem em conformidade com requisitos internos e requisitos legais intrínsecos à atividade da indústria farmacêutica.

- Revisão da Qualidade do Produto: A Revisão da Qualidade do Produto consiste numa revisão periódica do estado de qualidade de cada produto, tendo como finalidade avaliar a robustez do processo de fabrico, identificar tendências e averiguar a necessidade de implementação de ações preventivas e corretivas.

Nesta atividade, a GQ compila os resultados obtidos de parâmetros analíticos de controlo em processo e de libertação de lote, de acordo com a documentação registada pelo detentor de AIM, e efetua a respetiva avaliação, da qual podem emergir ações corretivas/preventivas com vista à melhoria do processo e da qualidade do produto. A Revisão da Qualidade do Produto deverá ser concluída no ano seguinte ao ano da revisão.

Parte 3: Vacina Universal do vírus influenza: Mito ou Realidade?



Orientadora: Professora Doutora Ana Miguel Matos

Abreviaturas

Abs – *Antibodies*

BM2 – *Influenza B matrix protein*

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

HA – *Hemagglutinin*

HAI – *Hemagglutination inhibition*

IAV – *Influenza A virus*

IBV – *Influenza B virus*

ICV – *Influenza C virus*

M1 – *Matrix protein 1*

M2 – *Matrix protein 2*

M2e – *Ectodomain of the matrix protein 2*

mAbs – *Monoclonal antibodies*

mRNA – *Messenger ribonucleic acid*

MVA – *Modified Vaccinia virus Ankara*

NA – *Neuraminidase*

NAbs – *Neutralizing antibodies*

NEP – *Nuclear export protein*

NP – *Nucleoprotein*

NS1 – *Nonstructural protein 1*

PA – *Polymerase acidic*

PB1 – *Polymerase basic 1*

PB2 – *Polymerase basic 2*

RNA – *Ribonucleic acid*

TIV – *Trivalent inactivated vaccine*

VLP – *Virus-like particle*

vRNP – *Viral ribonucleoprotein*

WHO – *World Health Organization*

Resumo

Pertencentes à família *Orthomyxoviridae*, os vírus influenza classificam-se em quatro géneros, A, B, C e D, sendo que apenas os tipos A e B estão associados a patologia humana severa. Na população humana atualmente circulam os subtipos H1N1 e H3N2 do vírus influenza A e duas linhagens antigenicamente distintas do vírus influenza B, *Yagamata* e *Victoria*.

Os vírus influenza são responsáveis por epidemias sazonais e por pandemias esporádicas de doença respiratória aguda, com impacto significativo na saúde pública (mortalidade e morbidade elevadas, maioritariamente associadas à população idosa) e na economia das sociedades.

Atualmente, a vacinação representa o meio mais efetivo para prevenir esta infeção, porém apresenta algumas limitações, tais como a indução de uma resposta imunológica de curta duração e fundamentalmente de natureza humoral, a diminuição ou até abolição da sua eficácia pela ocorrência de um fenómeno designado de variabilidade antigénica (*antigenic drift* e *antigenic shift*, respetivamente) e por fim o extenso período de tempo inerente ao processo de fabrico da vacina que põe em causa a disponibilização da mesma em tempo útil.

Face a estes handicaps, a comunidade científica tem procurado desenvolver através de diferentes abordagens, uma vacina universal que induza uma total e duradoura proteção imunitária, que possa ser disponibilizada de acordo com as necessidades da população. Estas abordagens centram-se em antígenos virais dotados de epítomos conservados, nomeadamente o domínio da haste da hemaglutinina, o ectodomínio da proteína da matriz 2 e as proteínas internas (nucleoproteína e proteína da matriz 1).

Palavras-chave: Vírus influenza, variações antigénicas, gripe, saúde pública, vacina universal

Abstract

The influenza viruses, belonging to the *Orthomyxoviridae* family, are classified into four genus, A, B, C and D, but only type A and B are associated with severe human pathologies. In the human population circulate currently the H1N1 and H3N2 subtypes of the influenza A virus and two lineages antigenically distinct of the influenza B, *Yagamata* and *Victoria*.

Influenza viruses are responsible for seasonal epidemics and sporadic pandemics of acute respiratory disease, with significant impact on public health (such as high mortality and morbidity, mainly associated with elderly population) and on the economy of societies.

Vaccination is currently the most effective way of prevent this infection, but it has some limitations, such as the induction of a short-term and basically humoral immunological response. It also decreases or even nullifies its efficiency caused by a phenomenon known as antigenic variability (antigenic drift and antigenic shift, respectively). Finally, the long period of time for the vaccine manufacturing process compromises its practical usefulness.

Faced these handicaps, the scientific community has searched to develop a universal vaccine, through different approaches, that induce a total and long lasting immune protection, available to the population, according specific needs. The approaches are focussed on viral antigens with conserved epitopes, like the domain of the stalk hemagglutinin, the ectodomain of the matrix protein 2 and internal proteins (nucleoprotein and matrix protein 1).

Keywords: Influenza virus, antigenic variations, influenza, public health, universal vaccine

Introdução

Os vírus influenza são agentes infecciosos responsáveis pela doença respiratória aguda e contagiosa, vulgarmente designada de gripe. A gripe transmite-se de pessoa para pessoa através de gotículas infetadas e caracteriza-se por um curto período de incubação, febres altas, sintomas respiratórios (congestão nasal e rinorreia) e sistémicos (dores musculares, cefaleias, fadiga e prostração). Habitualmente, a gripe é uma condição de saúde autolimitada, com resolução num curto período de tempo, não ultrapassando as duas semanas (1). No entanto, idosos, crianças com idade inferior a cinco anos, grávidas e indivíduos com outras situações clínicas subjacentes (asma, doença pulmonar obstrutiva crónica, doença cardíaca, entre outras) apresentam maior suscetibilidade de desenvolver determinadas complicações, de agravar situações crónicas pré-existentes, ou em última instância constituir uma ameaça à vida (1,2).

Anualmente, ao vírus influenza estão associados elevados índices de morbilidade e mortalidade na população humana, sendo que a vacinação representa o meio mais efetivo para prevenção das epidemias sazonais (2). Contudo, existem fragilidades inerentes à produção e à utilização da vacina. Em primeiro lugar, as variantes antigénicas incluídas na vacina podem não corresponder às estirpes circulantes, o que diminui expressivamente a sua eficácia (3). Pode igualmente acontecer que perante um vírus com potencial pandémico se desencadeie uma resposta imunitária mínima ou nula após a vacinação. Ainda a este propósito, a imunidade protetora induzida pela vacina, fundamentalmente de natureza humoral, tem curta duração, pelo que deve ser administrada numa base anual (4). Por último, importa salientar a morosidade inerente ao processo de desenvolvimento da vacina, devido ao tempo necessário para identificação das estirpes predominantes que circulam na população humana e do tempo afeto à produção da vacina. Este facto põe em causa a disponibilidade da vacina em tempo útil, sobretudo em contexto de pandemia (3,5).

As limitações acima descritas, bem como o impacto negativo que decorre da infeção pelo vírus influenza, evidenciam indubitavelmente a necessidade de desenvolver uma vacina que possa garantir à população uma imunidade protetora ampla, se não mesmo total, e concomitantemente duradoura (6). Será também fundamental a criação de novas plataformas de produção, que permitam em situação de surto a rápida disponibilização da vacina à população (3). Para dar resposta a esta realidade, encontram-se em fase pré-clínica e clínica diferentes abordagens que se baseiam em antigénios dotados de epítomos conservados e cujo objetivo último será alcançar uma vacina universal (7).

I. Vírus influenza

Pertencentes à família *Orthomyxoviridae*, os vírus influenza são classificados em quatro géneros: A, B, C e D, sendo que apenas o *influenza A virus* (IAV), o *influenza B virus* (IBV) e o *influenza C virus* têm a capacidade de infetar o ser humano. O IAV é o que apresenta maior impacto na saúde pública, podendo originar epidemias e pandemias (8). O IBV com menor potencial patogénico, pode estar na origem de epidemias e, por último o *influenza C virus*, manifesta-se geralmente de forma suave ou até assintomática (9,10). Os IAV e IBV, para além do Homem, podem infetar outras espécies animais, embora a gama de hospedeiros do IBV seja mais restrita (9,11). O *influenza D virus* tem como hospedeiros apenas os animais, nomeadamente os suínos e os bovinos (12).

De acordo com as propriedades antigénicas das glicoproteínas de superfície, o IAV está agrupado segundo dezoito subtipos de *hemagglutinin* (HA) (H1-H18) e 11 subtipos de *neuraminidase* (NA) (N1-N11). Na população humana circulam atualmente os subtipos H1N1 e H3N2 do IAV e duas linhagens antigenicamente distintas de IBV, *Yagamata* e *Victoria* (9).

A presente monografia centra-se no IAV e no IBV, dado que as infeções originadas por estes dois géneros são as que potencialmente podem traduzir-se em patologia humana severa (9,10).

I.1 Estrutura

No que diz respeito à morfologia, os vírus influenza caracterizam-se por um amplo pleomorfismo (1). O IAV e o IBV, estruturalmente indistinguíveis por microscopia eletrónica, podem apresentar-se sob a forma esférica ou tubular tipo “cordão” (*cord-like*) (1,13).

Os vírus influenza apresentam uma bicamada lipídica externa denominada envelope, com origem na membrana citoplasmática da célula hospedeira (1). O envelope contém espículas de duas glicoproteínas virais, a HA e a NA. No envelope existe ainda a *matrix protein 2* (M2) no IAV ou a *influenza B matrix protein 2* (BM2) e a proteína NB no IBV. Abaixo da membrana viral, localiza-se uma camada proteica constituída pela *matrix protein 1* (M1) (9).

No interior da matriz, encontram-se a *nuclear export protein* (NEP), também designada por *nonstructural protein 2*, e o complexo de *viral ribonucleoprotein* (vRNP) (13). Este complexo é composto por oito segmentos de *ribonucleic acid* (RNA) de cadeia simples de polaridade negativa, por uma RNA polimerase RNA dependente acoplada a cada segmento de RNA e pela *nucleoprotein* (NP) que forma uma nucleocápside que envolve os componentes anteriores. A replicase viral é dotada de uma estrutura trimérica formada pela *polymerase basic 1* (PB1), *polymerase basic 2* (PB2) e pela *polymerase acidic* (PA) (9).

Consoante a NP e as proteínas da matriz podem ser distinguidos os diferentes géneros do vírus influenza (1).

Os oito segmentos de RNA viral são numerados por ordem decrescente de comprimento. No IAV e no IBV os segmentos 1, 3, 4 e 5 codificam as proteínas PB2, PA, HA e NP, respetivamente. A PB1 é expressa pelo segmento 2 nos vírus influenza, contudo em algumas estirpes do IAV este segmento codifica uma proteína acessória com atividade pro-apoptótica. No IAV o segmento 6 produz a NA, enquanto no IBV, para além desta glicoproteína, é também responsável pela proteína NB. Já o segmento 7 codifica a M1 em ambos os subtipos, embora no genoma do IAV a M2 seja também expressa por este segmento, num fenómeno designado *splicing* do RNA e no IBV codifique ainda a BM2. Por último, o segmento 8 (ou também designado gene não-estrutural), através do processo de *splicing* do RNA codifica duas proteínas distintas, a proteína antagonista do interferão, *nonstructural protein 1* (NS1), e a NEP (13).

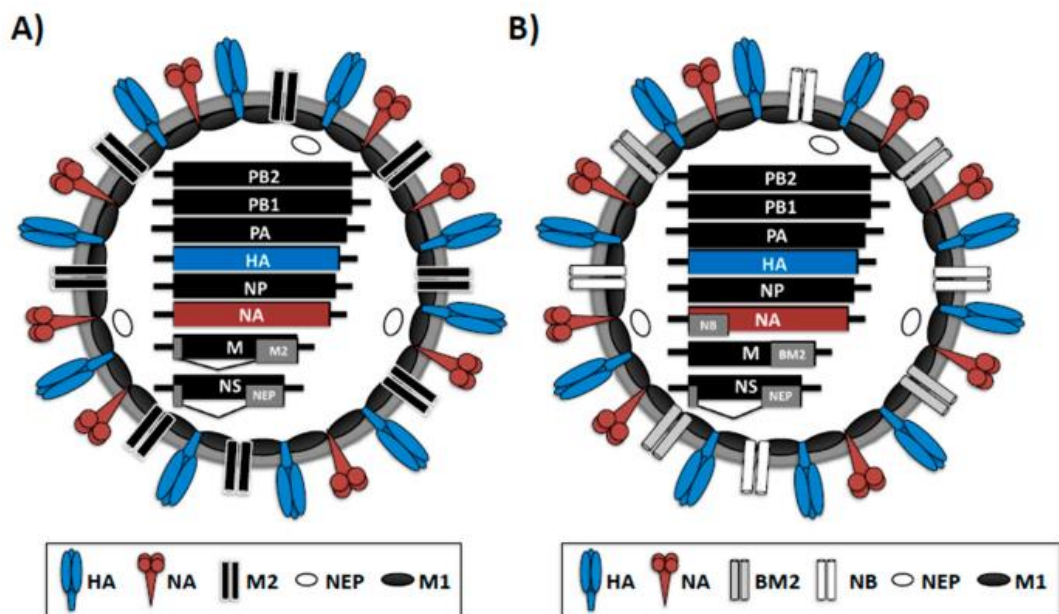


Figura 1 - Estrutura do IAV (A) e do IBV (B). Imagem adaptada de (9).

1.2 Ciclo de vida

O vírus influenza, à semelhança de todos os outros vírus, é um parasita intracelular obrigatório, ou seja, apenas se consegue reproduzir (por processos de replicação e transcrição) no interior de células vivas, utilizando, para isso, as condições biossintéticas das células hospedeiras. Desta forma, a entrada do vírus na célula hospedeira é essencial para que seja despoletada uma infeção (1).

Ao penetrar no organismo humano é desencadeada uma ligação entre os locais específicos da subunidade I da proteína de adsorção viral, a HA, e o recetor celular

expresso à superfície da célula hospedeira (1,9). Este recetor consiste numa glicoproteína com o carbono 2 do terminal de ácido siálico ligado ao carbono 3 (ligações α -2,3) ou 6 (ligações α -2,6) de uma molécula de galactose. No epitélio respiratório humano prevalecem os recetores com ligações α -2,6 (reconhecidos por vírus influenza humanos), embora também existam recetores de ligações α -2,3 (específicos de vírus influenza de origem aviária) (13,14). Enquanto os recetores de ligações α -2,6 se encontram maioritariamente no trato respiratório superior, os recetores de ligações α -2,3 localizam-se sobretudo ao nível dos alvéolos e dos bronquíolos (13).

Após a adsorção, o vírus sofre endocitose. No endossoma ocorre um conjunto de fenómenos que têm por finalidade a descapsidação do vírus (13). Assim, a glicoproteína trimérica HA é clivada por proteases, produzidas particularmente em caso de inflamação pelas células do sistema respiratório, em duas subunidades, a subunidade HA1 e a subunidade HA2 (anteriormente unidas por pontes dissulfureto) (1). Esta alteração conformacional possibilita a exposição do peptídeo de fusão presente na subunidade HA2, conduzindo conseqüentemente à fusão do envelope viral com a membrana do endossoma (1,13). Simultaneamente, no interior da vesícula endossomal estão presentes iões H^+ , que através de um canal iónico (M2) acidificam o interior do virião (13). A diminuição de pH permite a dissociação da matriz e a formação de poros que medeiam a libertação do complexo de vRNP para o citoplasma da célula hospedeira (1).

Uma vez libertada do virião, a vRNP difunde para o núcleo e iniciam-se os processos de transcrição e replicação do genoma viral que se caracterizam pela acção da polimerase viral sobre a cadeia molde de RNA. Destes processos resultam cadeias de *messenger ribonucleic acid* (mRNA), que posteriormente serão traduzidas em proteínas nos ribossomas do retículo endoplasmático, e cadeias de RNA viral que constituirão o genoma dos novos viriões. As proteínas traduzidas são transportadas para o aparelho de Golgi e os segmentos de RNA são exportados para o citoplasma da célula hospedeira por acção da M1 e da NEP (13).

Na membrana celular vão-se intercalando HA, NA, e M2, concomitantemente com a reunião e montagem das restantes proteínas virais e da vRNP que ocorre no citoplasma junto a essa mesma porção da bicamada lipídica. Somente os viriões com oito segmentos de RNA distintos serão dotados de carácter infeccioso (1).

Finalmente ocorre a libertação das novas partículas virais por exocitose, verificando-se a formação do envelope viral a partir da membrana da célula infetada (1). Embora se encontrem no meio extracelular, os novos viriões apresentam uma reduzida capacidade infecciosa, visto que se encontram vinculados uns aos outros e à célula infetada através da

ligação da HA com unidades de ácido siálico. Deste modo, é fundamental a atividade da NA como enzima hidrolítica. Ao remover o ácido siálico das glicoproteínas, a NA promove a libertação e a distribuição dos vírus (13).

1.3 Variabilidade antigénica

Os vírus influenza são geneticamente instáveis. Ao longo do tempo, os antígenos de superfície (HA e NA) vão sofrendo alterações por mecanismos genéticos específicos designados variação antigénica menor/suave (*antigenic drift*) e variação antigénica maior/drástica (*antigenic shift*) (15). Ao contribuírem para a emergência constante de diferentes vírus influenza, estes processos são os responsáveis pelas epidemias sazonais e pandemias (9).

A variação antigénica menor sucede de forma contínua, conduzindo a uma alteração gradual da estrutura antigénica viral (15). Ocorre por acumulação de mutações pontuais nos genes da HA e/ou da NA causadas pela elevada taxa de erro da polimerase viral durante a replicação do genoma e da adaptação do vírus aos anticorpos do hospedeiro (pressão imunológica) (7,15). Este tipo de variabilidade antigénica pode estar na origem da diminuição da eficácia das vacinas convencionais (3). As novas estirpes (dentro do mesmo subtipo) irão apresentar transformações no tropismo viral, que promovem a capacidade para escapar aos *neutralizing antibodies* (NAbs) (origem na vacinação ou numa infeção natural) e, consequentemente de replicar e causar doença. A variação antigénica menor pode ainda resultar na resistência à terapêutica antiviral, nomeadamente aos inibidores da NA (9).

A variação antigénica maior consiste numa alteração brusca da antigenicidade das estirpes virais. Resulta da recombinação genética de dois IAV diferentes que co-infetam a mesma célula hospedeira, envolvendo a troca de segmentos de genes completos. Este tipo de variação antigénica origina um novo subtipo de IAV, com um novo perfil antigénico (HA ou HA/NA), que quando dotado de ótimas capacidades de replicação, transmissão pessoa a pessoa e de evasão ao reconhecimento pelo sistema imunológico poderá conduzir a uma pandemia, minimizando ou até anulando o efeito protetor da vacina (3,9).

1.4 A gripe

Os vírus influenza são responsáveis pela patologia respiratória aguda e contagiosa, vulgarmente designada de gripe (1). A gripe transmite-se de pessoa a pessoa através da inoculação direta de gotículas infetadas provenientes da tosse ou dos espirros. Menos frequentemente, a transmissão acontece por inoculação indireta de partículas infecciosas (tocar numa superfície ou objeto contaminados e, de seguida, levar a mão à boca ou ao nariz) (16).

A infecção pelo vírus influenza caracteriza-se por um curto período de incubação (cerca de 2 dias), sendo que a eliminação das partículas infecciosas começa 1 dia antes do aparecimento dos sintomas e perdura por 5 a 7 dias após os mesmos (exceto em crianças e em indivíduos imunodeprimidos em que este período se pode prolongar) (16,17).

A gripe é caracterizada pela ocorrência abrupta de febre, sintomas respiratórios (congestão nasal e rinorreia) e sistêmicos (dores musculares, cefaleias, fadiga e prostração) (1,16). Habitualmente, apresenta-se como uma condição de saúde autolimitada, com resolução a breve prazo, não ultrapassando as duas semanas. No entanto, em populações mais vulneráveis, tais como idosos, crianças com idade inferior a cinco anos, grávidas e indivíduos com outras situações clínicas subjacentes (asma, doença pulmonar obstrutiva crónica, doença cardíaca, entre outras), existe maior suscetibilidade de desenvolver determinadas complicações (bronquite, pneumonia, infeções auriculares e Síndrome de Reye), de exacerbar situações crónicas pré-existentes e, em situações de extrema gravidade pode mesmo conduzir à morte (1,4).

1.5 Terapêutica Antiviral

Atualmente, as alternativas terapêuticas para o controlo da infecção pelo vírus influenza são limitadas (9). Existem apenas duas classes de agentes antivirais aprovadas para o tratamento e profilaxia da gripe e que apresentam como alvo a M2 (Amantadina e Rimantadina) ou o local ativo da NA (Oseltamivir, Zanamivir, Peramivir e Laninamivir). Enquanto os inibidores da M2 impedem a descapsidação do vírus, os inibidores da NA impossibilitam a libertação dos vírus da célula infetada (18). É ainda importante evidenciar que a maioria das estirpes sazonais circulantes é resistente aos inibidores da M2 e que, por este motivo a *World Health Organization* (WHO) recomenda os inibidores da NA (que apresentam menor frequência de desenvolvimento de estirpes resistentes) como tratamento de primeira linha (16).

1.6 Impacto na saúde humana

O vírus influenza é responsável todos os anos por epidemias globais caracterizadas por numerosos casos de morbidade e mortalidade, evidenciando-se como um dos maiores problemas de saúde pública (9). Esta mesma realidade acarreta aos vários Governos um elevado ónus financeiro traduzido nos honorários dos profissionais de saúde, exames auxiliares de diagnóstico, terapêutica instituída, internamento hospitalar, comprometimento da assiduidade laboral, entre outros (2). Segundo dados da WHO, as infeções sazonais pelo vírus influenza que ocorrem à escala mundial resultam em cerca de 1 bilião de infetados, 3 a 5

milhões de casos de doença severa e 250 000 a 500 000 mortes (maioritariamente na população idosa) por ano (2,9).

De forma esporádica surge na população humana um novo IAV, que na ausência de imunidade específica, está na origem do desenvolvimento de uma pandemia severa. Exemplos que retratam este facto são a Gripe Espanhola de 1918, a Gripe Asiática de 1957 e a Gripe de Hong Kong de 1968, provocadas respetivamente pelos IAV H1N1, H2N2 e H3N2, com particular destaque para a Gripe Espanhola que originou cerca de 50 milhões de mortes em todo o mundo. É ainda de salientar a Pandemia de 2009 causada pelo IAV H1N1 de origem suína e que, em menos de um ano, infetou mais de 600 000 indivíduos em todo o mundo (9).

2. Vacinas Convencionais

As inquietações no âmbito da saúde pública relacionadas com a infeção pelo vírus influenza assumem particular relevo perante a facilidade de transmissão do vírus, bem como das limitações identificadas nas alternativas terapêuticas. Considerando a realidade anteriormente descrita, assume-se a vacinação como o método mais eficaz para a proteção do Homem contra as infeções sazonais (9).

O público-alvo do programa de vacinação difere nos vários países, sendo que em Portugal a vacina é fortemente recomendada a indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos, doentes crónicos ou imunodeprimidos (a partir dos 6 meses de idade), grávidas e profissionais de saúde ou outros prestadores de cuidados (4,19).

Dada a curta duração da resposta imunológica induzida pela vacina e tendo em conta a variabilidade antigénica do vírus influenza é aconselhada a revacinação anual, realizada previamente à estação de Inverno (no mês de Outubro, no caso de Portugal) (4,6,20).

A vacinação visa a indução da resposta imunitária para proteção contra a infeção e doença, mas também para atenuar a transmissão do vírus na população (4).

Contudo, a eficácia da vacinação está dependente da correspondência entre as estirpes circulantes e as estirpes isoladas que foram incluídas na vacina (6). Tal correspondência é muitas vezes difícil de alcançar devido a uma combinação de fatores. Primariamente, os vírus influenza estão de forma contínua a sofrer variação antigénica menor, o que conduz ao aparecimento de estirpes que são capazes de escapar à imunidade pré-existente. Por este motivo, as vacinas são reformuladas anualmente e as variantes antigénicas isoladas a incorporar na sua composição são selecionadas com base numa intensa vigilância efetuada pelos Centros colaboradores da WHO (21). Por outro lado, de modo a disponibilizar atempadamente a vacina à população e considerando o extenso período de

tempo afeto ao seu processo de fabrico (preparação de vírus com perfis de segurança favoráveis e com capacidade de crescimento em ovos, preparação de reagentes de referência, produção e controlo de qualidade das doses de vacina, atividades das autoridades regulamentares), as estirpes devem ser selecionadas cerca de 7 a 9 meses antes da estação da gripe em que serão usadas (9,22). Porém, as previsões das estirpes circulantes podem ser imprecisas, decorrendo uma diminuição acentuada da eficácia da vacina. Para além disso, é importante salientar que no caso de um novo vírus com potencial pandémico, a vacina confere uma mínima ou até nula proteção (3).

Abordando ainda a temática da eficácia da vacinação, importa ressaltar que a mesma é também condicionada pelas características singulares de cada indivíduo. De uma forma geral, a eficácia é elevada em crianças e adultos saudáveis (9). O mesmo pode já não se verificar na população idosa, resultado da sua maior exposição ao processo de imunossenescência (9,23).

2.1 Vacinas inativadas

Presentemente, a *trivalent inactivated vaccine* (TIV), cuja composição assenta nas três estirpes de vírus influenza circulantes na população humana (H1N1 e H3N2 do IAV e o IBV), é a vacina mais amplamente utilizada (4).

As vacinas inativadas, produzidas tradicionalmente a partir de ovos embrionados de galinha, podem apresentar-se sob três tipos de formulação, tais como: vacina de vírus inteiro inativado, vacina de *split-virus* e vacina de subunidade (4). No caso das vacinas de vírus inteiro, após a produção dos vírus, decorre uma etapa de purificação, seguida de inativação por formaldeído. Estas vacinas mostram-se seguras e apresentam uma eficácia de 60%-90% em crianças e adultos. Por outro lado, as vacinas de *split-virus* exibem todas as proteínas virais e elementos subvirais após sofrerem um passo adicional de dissociação do envelope viral por um detergente não iónico. A vacina de subunidade, contrariamente às vacinas baseadas em vírus, consiste em proteínas virais purificadas (HA ou HA/NA) (9). Este tipo de formulação pode também ser sintetizado utilizando culturas celulares de mamíferos (*Madin Darby canine kidney*) ou novas abordagens que têm como base as tecnologias de *deoxyribonucleic acid* (DNA) recombinante e sistemas de expressão (baculovírus) (4,9).

Nos dias de hoje, as vacinas de subunidade e as vacinas de *split-virus* têm maior representatividade já que apresentam idêntico carácter imunogénico (em populações *primed*) e menor frequência de efeitos adversos quando comparadas às vacinas de vírus inteiros. No caso de indivíduos, particularmente crianças, que nunca tenham contactado com o vírus ou sido vacinadas, as vacinas de subunidade e as vacinas *split-virus* são menos imunogénicas

(4,24). Por este motivo, e de forma a atingir um título de anticorpos de *hemagglutination inhibition* (HAI) seroprotetor (1:40) devem ser administradas duas doses com quatro semanas de intervalo (4,25).

As vacinas inativadas são administradas por via intramuscular (embora também esteja disponível uma formulação intradérmica) e induzem principalmente imunidade humoral mediada por NAbs que têm como alvo a HA. Nas vacinas em que a NA está presente são também produzidos *antibodies* (Abs) anti-NA que não têm função neutralizante, mas que podem atenuar a severidade da doença (4).

Hoje em dia está também disponível uma vacina inativada quadrivalente do tipo *split-virus*, que para além das três estirpes H1N1 e H3N2 do IAV, contempla ainda as duas linhagens antigénicas do IBV (*Yagamata* e *Victoria*) (9). Esta vacina mostrou ter um perfil imunogénico e de segurança comparável ao da vacina trivalente e simultaneamente diminuiu a possibilidade de não correspondência entre as estirpes circulantes e as estirpes incorporadas na vacina (8).

2.2 Vacinas vivas atenuadas

As vacinas vivas atenuadas foram desenvolvidas com o intuito de mimetizar uma infeção natural. Surgiram pela primeira vez em 1960, através da passagem em série do vírus em ovos, utilizando condições sub-ótimas de temperatura. Daí resultaram vírus dotados de fenótipos sensíveis à temperatura, que crescem a 25°C, mas não a temperaturas superiores a 35°C (temperatura do trato respiratório inferior) (4). Por este facto, e pela sua administração ocorrer pela via intranasal, este fenótipo restringe a replicação do vírus ao trato respiratório superior e permite induzir imunidade humoral local (incluindo os NAbs) e uma resposta imunológica celular (9). Apresentando-se estáveis, imunogénicos e desprovidos de capacidade de transmissão, estes vírus são utilizados para o desenvolvimento de estirpes *master donor* (4).

As atuais vacinas vivas atenuadas são constituídas por seis genes pertencentes a um *master donor virus* atenuado (que codificam proteínas da matriz, NEP, NS1, PB2, PBI, PA e NP) e por segmentos codificantes das glicoproteínas de superfície, HA e NA, das estirpes sazonais selecionadas. Os *master donor virus* que se encontram em utilização são o A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) e no B/Ann Arbor/1/66 para o IAV e IBV, respetivamente (9). A sua produção decorre por recombinação clássica em ovos (4).

Apesar de licenciadas para uso clínico, as vacinas vivas atenuadas não são aconselhadas a indivíduos imunodeprimidos, asmáticos, grávidas e indivíduos que estão em

contacto direto com populações vulneráveis e não estão aprovadas para crianças com idade inferior a dois anos (4,9,26).

3. Vacina Universal

Face ao impacto do vírus influenza na saúde humana e às limitações anteriormente enunciadas para as vacinas da gripe licenciadas, torna-se imprescindível o desenvolvimento de novas vacinas que induzam uma ampla, e se possível total, e duradoura proteção imunitária. É também fulcral que o processo de fabrico da vacina seja eficiente, disponibilizando a mesma à sociedade de acordo com as suas reais necessidades (3).

Considerando que o IAV é o agente mais associado a epidemias e pandemias e que detém a maior gama de hospedeiros, os novos candidatos (vacinas) centram-se preferencialmente neste género, contudo não abdicam da investigação para o IBV (27). Estes candidatos assentam o seu paradigma em antígenos virais dotados de epítomos conservados, designadamente o domínio da haste da HA, o *ectodomain of the matrix protein 2* (M2e) e as proteínas internas, incluindo a NP e a MI. O mecanismo de proteção destas vacinas está dependente não somente da/o proteína/domínio selecionada/o, bem como da estratégia de vacinação (7).

Todas as abordagens acima enumeradas, que se encontram em diferentes etapas de desenvolvimento clínico, visam alcançar um único objetivo – a vacina universal –, ou seja, uma vacina com um raio de ação que integre todos os IAV e IBV, independentemente do subtipo de HA/NA ou de variações *drift* possam ocorrer (7).

Para o desenvolvimento de uma vacina amplamente protetora, e idealmente universal, é fundamental considerar vários aspetos críticos, especificamente a duração da resposta imunológica, a evasão viral à imunidade, o bloqueio da transmissão viral, o efeito da imunidade pré-existente na eficácia da vacina, a segurança e os recursos económicos necessários ao seu desenvolvimento (6).

3.1 Domínio da haste da HA

A estrutura da HA apresenta dois domínios principais, o domínio da cabeça globular (contendo a maioria da subunidade HA1), responsável pela adsorção à célula hospedeira, suportado pelo domínio da haste (onde se localiza a subunidade HA2), que medeia a fusão da membrana do endossoma viral e, conseqüentemente, a libertação da vRNP para o citoplasma da célula hospedeira (13,28).

Contrariamente ao domínio da cabeça globular, o domínio da haste da HA é relativamente conservado entre os vírus do grupo I (H1, H2, H5,H6, H8, H9, H11, H12,

HI3, HI6, HI7 e HI8), os vírus do grupo 2 (H3, H4, H7, H10, H14, H15) e os IBV, tornando-o numa das abordagens candidata a vacina universal (28). No entanto, é difícil induzir Abs contra este antígeno, visto que apresenta caráter imunossubdominante. Deste modo, as diferentes abordagens que têm como base o domínio da haste da HA e que atualmente se encontram em fase pré-clínica, visam originar um título protetor de Abs segundo duas estratégias principais, construção *headless* e HAs quiméricas (7).

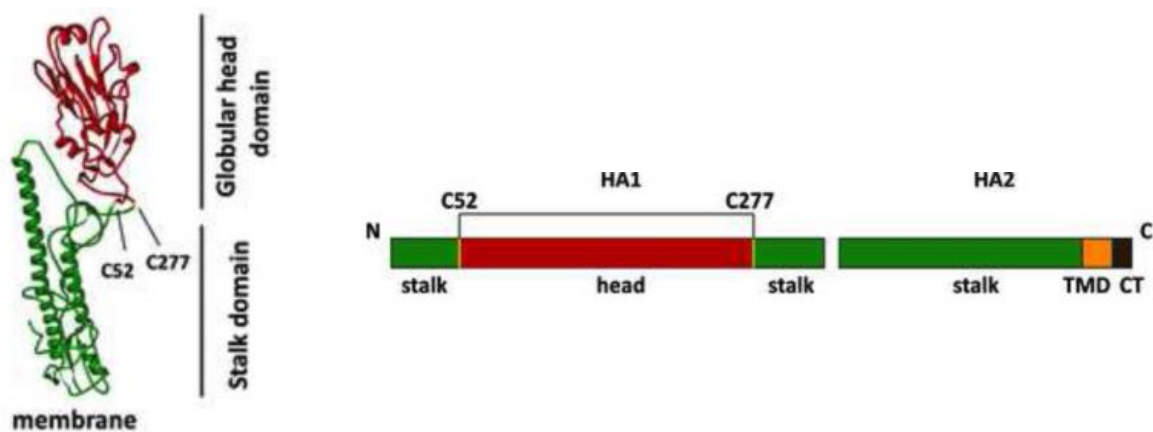


Figura 2 - Estrutura da HA do vírus influenza. Imagem adaptada de (28).

3.1.1 *Headless* HA

A primeira estratégia consiste na vacinação com construções de HA desprovidas da cabeça globular. A ausência da cabeça globular imunodominante visa aumentar o caráter imunogénico do domínio da haste (7).

Steel *et al.* usando técnicas moleculares modernas identificaram uma forma de expressar a molécula de HA desprovida do domínio da cabeça globular (PR8 *headless* HA), preservando a integridade da região da haste (21).

Para avaliar o seu potencial na indução de imunidade protetora utilizaram um modelo de rato e um regime de vacinação que contemplava três doses de vacina. Após a imunização, os ratos eram expostos à estirpe A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), designada PR8 (21).

Os resultados do ensaio provaram que a imunização dos ratos com a construção PR8 *headless* HA em formato de plasmídeo de DNA e *virus-like particle* (VLP) (sendo que a vacina de VLP apresentava também um adjuvante) conferiu proteção total contra a morte e parcial contra a perda de peso, o que indicou que estas construções podem ser suficientemente imunogénicas para induzir imunidade protetora contra a doença originada por vírus homólogos. No entanto, verificou-se que o grau de proteção proporcionado pela construção PR8 HA (cuja VLP incluía, além da HA, a proteína PR8 NA) foi superior à PR8

headless. Os investigadores acreditam que se deve por um lado à atividade dos Abs anti-NA, mas sobretudo à destruição de importantes epítomos neutralizantes localizados na cabeça globular da HA. Os Abs anti-PR8 *headless* HA demonstraram ainda, elevados níveis de reatividade contra HAs recombinantes derivadas de IAV sazonais H1N1, do vírus pandémico H1N1 de 2009 e moderada a elevada atividade contra os subtipos H2 e H5. Pelo contrário, estes Abs não foram reativos contra o subtipo H3 da HA. Perante estes resultados, os investigadores concluíram que os Abs anti-PR8 *headless* HA podem reconhecer um espectro mais amplo de variantes antigénicas do que os Abs anti-PR8 HA e que esse reconhecimento está limitado ao grupo I da HA, não se atestando o mesmo para do grupo 2 da HA (falta de conservação na região alvo entre os dois grupos) (21).

3.1.2 HAs Quiméricas

A segunda estratégia centra-se na utilização de HAs quiméricas que têm como base a combinação de domínios conservados da haste com cabeças globulares “exóticas” pertencentes a diferentes subtipos do IAV (7).

Krammer *et al.*, tendo em conta esta abordagem e de forma a estimular uma resposta imunológica robusta contra o domínio da haste, desenvolveram um estudo que consistia na exposição repetida de ratos (imunologicamente *naïve* para o domínio da cabeça globular do vírus) a HAs quiméricas constituídas por diferentes cabeças globulares (H9, H6 e H5) e pelo domínio conservado da haste da H1. Posteriormente ao regime de imunização, os ratos eram infetados com um IAV desafio do grupo I (H5N1, H6N1 ou estirpe H1N1) ou do grupo II (H3N2) (29).

Os resultados do ensaio mostraram a eficácia das HAs quiméricas na indução de uma imunidade protetora de amplo espectro contra IAV do grupo I, atestada por uma taxa de sobrevivência de 100% e por uma perda de peso não significativa. Porém, o mesmo não se verificou para os ratos expostos ao IAV do grupo 2, em que a taxa de sobrevivência foi reduzida e a perda de peso elevada. Estes factos permitiram concluir que a proteção providenciada pelas HAs quiméricas baseadas na haste da H1 parece estar limitada ao grupo de vírus que expressam HAs do grupo I (29).

3.2 Ectodomínio da proteína da matriz 2

De vinte e três aminoácidos de comprimento, o M2e representa o domínio extracelular N-terminal da M2, sendo relativamente conservado entre os IAV, particularmente nos aminoácidos localizados nas posições 2 a 9 (7,30). Todavia, os aminoácidos situados nas posições 10 a 24 são mais variáveis (não sendo ainda assim comparável à ampla variabilidade que contribui para as *antigenic drift* na HA e na NA). Assim,

não existe uma única sequência universal do M2e, o que implica que diferentes sequências devem ser incorporadas no candidato, de forma a permitir uma maior amplitude de cobertura relativa às estirpes do IAV (30). Ainda a propósito deste alvo (M2e), verifica-se que na sua forma natural é dotado de um pobre carácter imunogénico, provavelmente justificado pela sua reduzida expressão no envelope viral (contrariamente ao elevado número de cópias presentes na membrana da célula infetada) e ao seu pequeno tamanho (11).

Com o propósito de mitigar as duas limitações acima descritas, encontram-se em desenvolvimento pré-clínico e clínico diferentes abordagens, tais como, construções de DNA, proteínas recombinantes, peptídios sintéticos e VLPs. Na presente monografia vou centrar-me apenas nos candidatos que se encontram em fase de desenvolvimento clínico mais avançada (VLP e proteína recombinante) (30).

3.2.1 ACAM-FLU-A

ACAM-FLU-A é uma vacina recombinante que resultou da fusão do gene da proteína do core do vírus da hepatite B com três cópias *tandem* da sequência do M2e (27,30). Este gene de fusão, M2HBc, foi expresso de forma eficiente em *Escherichia coli*, resultando numa proteína de fusão que espontaneamente formou VLPs, nas quais a porção N-terminal do M2e está exposta à superfície, mimetizando assim a estrutura *wild-type* da proteína M2 nos vírus e nas células infetadas (31). Essas VLPs foram posteriormente purificadas e incluídas numa vacina designada ACAM-FLU-A (27).

Esta vacina foi utilizada num ensaio clínico de fase I que pretendia avaliar a sua segurança e imunogenicidade (32). O estudo envolveu 79 voluntários saudáveis com idades compreendidas entre os 18 e os 40 anos, que foram divididos em quatro grupos, especificamente o grupo imunizado com ACAM-FLU-A, o grupo vacinado com ACAM-FLU-A adicionada do adjuvante hidróxido de alumínio, o grupo que recebeu ACAM-FLU-A adicionada do adjuvante QS-21 e o grupo placebo (solução salina) (27,32).

Na população vacinada com ACAM-FLU-A, independentemente da presença ou ausência de adjuvante, não foram registados efeitos adversos graves, o que prova a segurança da vacina. Por outro lado, este candidato demonstrou ter capacidade imunogénica. A resposta imunitária mais elevada foi registada no grupo vacinado com ACAM-FLU-A adicionada do adjuvante QS-21, que apresentou cerca de 90% dos indivíduos seroconvertidos relativamente ao M2e (aumento de pelo menos quatro vezes no título de Abs anti-M2e) (27,30).

3.2.2 VAX102

VAX102 representa uma vacina que tem como base uma proteína de fusão recombinante (STF2.4×M2e) obtida em *Escherichia coli* e posteriormente purificada. Esta proteína é constituída por um ligando específico do recetor *Toll-like 5*, a flagelina tipo 2 da bactéria *Salmonella typhimurium*, fundido com quatro cópias *tandem* do M2e (33).

De forma a avaliar a segurança e a imunogenicidade da vacina VAX102, administrada por via intramuscular, foi realizado um ensaio clínico de fase I que incluiu um total de 76 adultos saudáveis com idades compreendidas entre os 18 e os 49 anos. Desses 76 indivíduos, 60 receberam duas doses de 0,3 µg, 1,0 µg ou 3 µg da vacina ou de placebo (solução tampão) ou uma dose de 10 µg de vacina. Os restantes 16 indivíduos receberam uma dose de 0,03 µg ou 0,1 µg de VAX102. Os efeitos adversos e a taxa de seroconversão foram os parâmetros utilizados para avaliar a segurança e a imunogenicidade, respetivamente. Pelos resultados do ensaio verificou-se que doses de 0,03 µg a 1 µg foram seguras e bem toleradas por todos os sujeitos. No entanto, enquanto doses de 0,03 µg e 0,1 µg produzem uma reduzida imunogenicidade após a segunda dose de vacina (38% e 75% respetivamente), as doses de 0,3 µg e 1 µg foram imunogénicas em 18 (75%) de 24 indivíduos vacinados depois da primeira dose e em 23 (96%) após a segunda dose. Para além disso, para as concentrações mais elevadas da vacina (3 µg e 10 µg) o título dos Abs anti-M2e e a taxa de seroconversão não foram significativamente mais elevadas do que as doses que apresentaram carácter imunogénico e ainda foram responsáveis por efeitos adversos severos. Face a este ensaio é possível inferir que a vacina VAX102 em doses de 0,3 µg e de 1 µg foi segura e que induziu elevados títulos de Abs específicos do M2e. A flagelina, promotora da ativação da resposta imune inata, ao estar fundida a múltiplas cópias do M2e, foi capaz de induzir um aumento de quatro vezes no nível de Abs nos humanos. É importante ainda destacar as vantagens de produção da vacina pela eficiente capacidade de expressão da *Escherichia coli* (33).

A vacina VAX102 foi ainda utilizada num estudo de fase I/II, no qual se avaliou a viabilidade da sua administração em combinação com TIV (vacina de subunidade), de modo a alcançar uma maior imunogenicidade e providenciar proteção cruzada. O ensaio envolveu 80 indivíduos saudáveis, com idades incluídas no intervalo dos 18 aos 49 anos, que foram divididos aleatoriamente em dois grupos. Através de administração intramuscular, cada grupo recebeu TIV e VAX102 ou TIV e placebo, sendo que a dor no local da injeção foi mais severa no grupo que recebeu a TIV e a VAX102. No que se refere à segurança, o estudo permitiu concluir que as vacinas utilizadas foram bem toleradas pelos dois grupos de voluntários, o que se atesta pelo facto dos sintomas locais e sistémicos se apresentarem de

severidade leve a moderada. Duas semanas após a imunização, a resposta de HAI dos Abs para os antígenos H1 e H3 presentes na TIV foi mais elevada no grupo que recebeu TIV e VAX102, embora estatisticamente não relevante. No que diz respeito ao antígeno B não houve qualquer diferença no título de HAI. Para além disso, no grupo que recebeu a combinação de vacinas 73 % dos indivíduos seroconverteram para o M2e (34).

Em suma, a combinação TIV e VAX102 é dotada de potencial para aumentar a resposta imunitária aos componentes da TIV do IAV e, simultaneamente para fornecer proteção cruzada contra estirpes do IAV que não são contempladas na TIV sazonal através da imunidade providenciada pelo M2e (34). A imunopotenciação da TIV revela-se importante na população idosa, pois a imunossenescência característica desta idade afeta negativamente a capacidade de resposta do sistema imunológico (23,34).

3.3 Proteínas internas (NP e MI)

A NP e a MI representam importantes proteínas estruturais que são altamente conservadas entre os subtipos do IAV, mas não entre o IVA e o IVB (7).

As proteínas internas localizam-se no interior da partícula viral ou da célula infetada, pelo que não estão acessíveis aos Abs. Porém, apresentam robustos epítomos de células T que podem providenciar uma forte reatividade cruzada potencialmente protetora contra o vírus influenza. As abordagens que têm como base estas proteínas encontram-se atualmente em fase de desenvolvimento clínico (7).

3.3.1 MVA-NP+MI

A vacina MVA-NP+MI consiste num vírus recombinante formado pela inserção dos genes das proteínas internas conservadas (provenientes da estirpe H3N2), NP e MI, num vetor viral específico, *Modified Vaccinia virus Ankara* (MVA) (35). MVA é um vírus altamente atenuado, obtido a partir da passagem em série em fibroblastos de embriões de galinha (3). Ao permitir a expressão dos genes das proteínas internas (sob a forma de uma proteína de fusão) nas células infetadas, pode ser utilizado para ativar ou reforçar as respostas *cross-reactive* das células T até níveis protetores, providenciando assim uma proteção de ampla cobertura antigénica para os subtipos de IAV (35).

A vacina MVA-NP+MI tem sido testada em ensaios clínicos de fase I e de fase II (23,35-37).

Nos ensaios clínicos de fase I, realizados em adultos jovens saudáveis (18-50 anos) e em indivíduos saudáveis com mais de 50 anos, a vacina administrada por via intramuscular demonstrou ser segura. Para além disso, induziu uma forte resposta imunológica caracterizada especificamente pelo aumento da resposta das células T, que foi similar em

ambas as populações etárias (23,35). Estes resultados têm particular interesse no caso de indivíduos com idade superior a 50 anos já que pode representar uma forma de ultrapassar a imunossenescência que contribui, por um lado para uma maior suscetibilidade dos idosos a doenças infecciosas, mas também para a diminuição da eficácia da vacinação sazonal. Neste contexto, foi ainda realizado um ensaio clínico de fase I que pretendia avaliar a segurança e a imunogenicidade da coadministração da vacina MVA-NP+MI com a TIV (vacina *split-virus*) em voluntários com idade acima dos 50 anos. Esta combinação de vacinas foi segura, sendo o perfil de reações adversas similar ao observado com a mesma dose de MVA-NP+MI administrada de forma isolada. Os resultados do estudo mostraram que no grupo que recebeu a combinação das vacinas, a resposta das células T dirigidas para as proteínas internas foi reforçada para um nível significativamente mais alto, comparativamente ao grupo que recebeu somente a vacina sazonal. As taxas de seroproteção e de seroconversão foram idênticas em ambos os grupos, contudo houve um aumento significativo no título de Abs para a estirpe H3N2 no grupo que recebeu a combinação de vacinas. Apesar de algumas combinações de vacinas conduzirem a interferência na resposta imunitária, este ensaio revelou que a coadministração da vacina MVA-NP+MI com a vacina sazonal pode aumentar a resposta humoral específica e induzir células T de memória capazes de reconhecer uma determinada gama de subtipos do IAV (36).

Mais tarde, a vacina MVA-NP+MI entrou também num ensaio clínico de fase IIa que tinha por finalidade determinar a segurança e imunogenicidade de uma dose específica da vacina e providenciar evidências da sua eficácia em adultos saudáveis (idades compreendidas entre os 18 e os 45 anos) após exposição a um vírus influenza desafio H3N2 (A/Wisconsin/67/2005) (37,38). Este estudo incluiu voluntários que apresentavam um título de Abs não mensurável contra o vírus teste (triagem inicial por ensaios de HAI) e que foram distribuídos por dois grupos, especificamente o grupo de voluntários ao qual era administrado por via intramuscular a vacina MVA-NP+MI e o grupo controlo que não era sujeito a vacinação. Após a vacinação dos indivíduos, todos os participantes foram sujeitos a administração intranasal do vírus A/Wisconsin/67/2005, seguida de um período de quarentena no qual se monitorizavam sintomas específicos da gripe e a disseminação do vírus. Os resultados do ensaio atestam um perfil de segurança satisfatório e um potencial imunogénico da dose de vacina que foi usada, na medida em que as reações adversas que ocorreram se mostraram ligeiras em termos de severidade e decorreu um aumento significativo das respostas das células T aos antigénios da vacina (NP e MI). Durante o período de quarentena, verificou-se que dois dos onze sujeitos vacinados e cinco indivíduos do grupo controlo desenvolveram a doença (gripe), que foi confirmada em laboratório quer

pelos sintomas, quer pela disseminação do vírus. Esta diminuição equivale a uma eficácia de 60% da vacina, que se traduz num nível de proteção semelhante que é verificado com a vacina sazonal quando as estirpes incluídas na vacina correspondem às estirpes circulantes. No entanto, são necessários estudos adicionais que incluam uma amostra populacional de maiores dimensões para determinar de forma precisa e robusta a eficácia da presente vacina. É ainda importante realçar que nos voluntários vacinados com MVA-NP+MI e que desenvolveram a doença, os sintomas da gripe foram menos pronunciados tanto em número como em severidade, registando-se ainda uma redução significativa do número de dias de disseminação do vírus. Este ensaio providencia, desta forma, a primeira demonstração de eficácia clínica de uma vacina da gripe que tem como base a resposta imunológica celular (37).

3.4 Novas abordagens

3.4.1 Multimeric-001

A vacina Multimeric-001 consiste numa proteína de fusão que contempla nove epítomos conservados de estirpes do IAV e do IBV dos genes da HA, NP e da MI. Produzida por expressão em *Escherichia coli* e posteriormente purificada, esta proteína recombinante é dotada de potencial para ativar quer a resposta imunológica humoral, quer a resposta imunológica celular (39).

Após completados os ensaios clínicos de fase I/II em adultos jovens (18-49 anos), adultos mais velhos (55-65anos) e em idosos (idade superior a 65 anos) nos quais demonstrou ser segura e suficientemente imunogénica para induzir imunidade humoral e celular, a vacina Multimeric-001 foi alvo de um ensaio clínico de fase II (27). Este ensaio tinha como finalidade a avaliação da segurança e imunogenicidade (HAI e imunidade mediada por células) em idosos (idade superior a 65 anos) aquando da utilização da vacina como *primer* da TIV sazonal (vacina *split-virus*) (40).

O estudo envolveu 120 idosos que foram aleatoriamente distribuídos por quatro grupos. Cada grupo recebeu, respetivamente, por via intramuscular: duas doses da vacina Multimeric-001 (grupo A), uma única dose da vacina Multimeric-001 (grupo B), uma única dose da vacina Multimeric-001 na presença do adjuvante fosfato de alumínio (grupo C) ou uma solução salina placebo (grupo D). Após a última dose da vacina Multimeric-001 ou da solução placebo todos os indivíduos receberam a TIV sazonal (40).

Apesar do reduzido tamanho da amostra de população, os resultados do ensaio permitem verificar que a combinação da vacina Multimeric-001 com a TIV apresenta um perfil de segurança positivo, que se atesta pelo facto de não se registarem diferenças

significativas no que se refere aos efeitos adversos entre os grupos que receberam a vacina Multimeric-001 e o grupo ao qual foi administrado placebo (40).

As células T dos participantes do grupo A e do grupo C foram isoladas e expostas *ex vivo* a antígenos do IAV (H1N1 e H3N2) e do IBV e a vírus vivos atenuados (presentes na vacina FluMist[®]), resultando numa elevada expansão dessas mesmas células, mais pronunciada no grupo A. Esta observação evidencia o potencial da vacina Multimeric-001 num regime individual, em que a resposta imunológica mediada pelas células T poderá ser suficiente para atenuar (ou até prevenir) a doença originada por uma ampla gama de estirpes do vírus influenza (40).

O *priming* com a vacina Multimeric-001 desencadeou um aumento da seroconversão relativamente às três estirpes contempladas pela TIV, comparativamente ao *priming* com o placebo, embora alguns participantes revelassem pré-existência de títulos de Abs específicos das estirpes incluídas na TIV. O aumento significativo no título de Abs específicos da estirpe suína pandémica H1N1 do IAV contida na TIV e o aumento da seroconversão relativamente a estirpes não contempladas pela TIV (ainda que em menor grau relativamente às estirpes da TIV), suporta o potencial da vacina Multimeric-001 como um *primer* amplamente protetor contra estirpes sazonais e estirpes pandémicas (40).

Este ensaio clínico demonstrou a capacidade da vacina Multimeric-001 para desencadear os dois tipos de imunidade adaptativa (humoral e celular) contra várias estirpes de vírus influenza, o que sustenta a sua possível utilização como *priming* da vacinação para populações vulneráveis, como os idosos, e em regime individual como candidato a vacina amplamente protetora (40).

3.4.2 FLU-v

A vacina FLU-v consiste numa mistura equimolar de quatro polipeptídeos sintéticos, cujas sequências representam epítomos conservados e reconhecidos pelas células T (41,42). Estes epítomos derivam da NP, da M1 e da M2 de estirpes humanas e animais de IAV e IBV (41).

A vacina FLU-v entrou num ensaio clínico de fase I que envolveu 48 participantes do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 18 e os 40 anos, e cujo objetivo se centrava na avaliação da segurança e da imunogenicidade. O total de voluntários foi aleatoriamente distribuído em seis grupos, especificamente quatro grupos experimentais que receberam, por via subcutânea, uma dose baixa (250 µg) ou alta (500 µg) de FLU-v na presença ou ausência de um adjuvante (ISA-51) e dois grupos controlo aos quais foi administrada uma solução salina na presença ou ausência de adjuvante. Os resultados

mostraram que a vacina FLU-v foi segura, não se verificando a incidência de efeitos adversos severos diretamente relacionados com a vacina. No que diz respeito à imunogenicidade, o estudo permitiu inferir que a resposta imunológica celular se traduziu numa resposta dose-dependente. Os resultados indicam que a resposta das células T duplicou comparativamente ao nível de pré-vacinação em cerca de 80% e 100% dos indivíduos que receberam as formulações com adjuvante nas doses de 250 µg e 500 µg, respetivamente. Nas formulações em que o adjuvante estava ausente, não ocorreu indução da resposta celular, nem da resposta humoral. Para além disso, nenhuma das preparações testadas induziu uma resposta humoral significativa (41).

Após ter completado com sucesso a fase I, a vacina FLU-v foi envolvida num ensaio clínico de fase Ib que pretendeu avaliar a segurança e a eficácia protetora (redução da sintomatologia e da disseminação do vírus) face a um vírus influenza teste. O ensaio abarcou 32 voluntários do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 18 e os 45 anos e seronegativos para o vírus influenza teste (*screening* pelo ensaio de HAI). Os participantes, aleatoriamente distribuídos por dois grupos, receberam por via subcutânea uma dose de 500 µg de FLU-v em solução salina e emulsificada com ISA-51 (adjuvante) ou uma solução salina emulsificada com ISA-51 (placebo). É importante destacar que antes da vacinação, não existiam diferenças na resposta imunológica celular dirigida para os antígenos da FLU-v entre os dois grupos. Em conformidade com os resultados obtidos no ensaio clínico de fase I, a vacinação com uma dose de 500 µg de FLU-v na presença de adjuvante foi, no geral, segura. Verificou-se apenas o aumento de alguns efeitos adversos no local da injeção (dor e inchaço), quer no grupo que recebeu a FLU-v quer no grupo placebo, o que é consistente com a utilização do adjuvante em ambos os grupos. Posteriormente à vacinação, todos os voluntários que receberam FLU-v desenvolveram resposta imunológica celular, contrariamente ao grupo placebo, apesar de que na maioria dos casos essa resposta foi relativamente fraca (duas a quatro vezes mais alta do que o valor do controlo negativo). Esta intensidade de resposta traduziu-se numa diferença não significativa no *score* de sintomas e na disseminação viral após a exposição ao vírus influenza teste, comparativamente ao grupo placebo. Porém, foi possível estabelecer que, apenas quando são originadas elevadas respostas imunológicas celulares, (aumento de pelo menos quatro vezes relativamente ao nível de pré-vacinação) há potencial para uma diminuição clinicamente relevante da disseminação viral e do *score* de sintomas. Assim, é necessário aumentar a dose ou o número de imunizações da FLU-v para induzir uma resposta imunológica celular elevada. Foi também notável que as taxas de infeção no grupo placebo e no grupo experimental não foram significativamente diferentes. Foram avaliados as respostas de HAI para o vírus

influenza inoculado antes e após a vacinação, sendo que não foram registados títulos de HAI superiores a 10. Face a estes resultados, infere-se que elevados níveis de resposta imunológica celular, mesmo na ausência de Abs, poderão ter capacidade de diminuir a disseminação viral e o score de sintomas, mas não a taxa de infeção (43).

Atualmente, o candidato FLU-v encontra-se num ensaio clínico de fase IIb que visa a determinação da segurança e da imunogenicidade de diferentes doses e formulações, com base na observação de efeitos adversos e na avaliação da imunidade mediada por células e por Abs, respetivamente. Este ensaio inclui 222 voluntários saudáveis, com idades compreendidas entre os 18 e os 60 anos, que foram aleatoriamente distribuídos para receber por via subcutânea duas doses de uma suspensão salina de 500 µg de FLU-v (grupo 1), uma dose de 500 µg de FLU-V emulsificada em ISA-5I (adjuvante) e em água para injeção seguida de uma dose de solução salina (grupo 2), duas doses de solução salina (grupo 3) ou uma dose da emulsão de ISA-5I em água para injeção seguida de uma dose de solução salina (grupo 4) (44).

O potencial de aplicações de uma vacina que estimula a imunidade celular contra regiões conservadas do vírus influenza não se restringe à utilização da vacina FLU-v num regime individual. Esta vacina pode ser combinada com as vacinas sazonais, de forma a aumentar a sua eficácia por mecanismos imunitários celulares antivirais que não são explorados pelas vacinas atuais. Do mesmo modo, em cenário de pandemia, a vacina FLU-v pode ser usada como estratégia de controlo da doença, até que a vacina específica da estirpe pandémica se torne disponível (41).

3.4.3 FP-01.1 (Flunisyn™)

A vacina FP-01.1 é constituída por uma mistura de seis peptídeos sintéticos conjugados com uma fração de fluorcarbonetos. Estes peptídeos, obtidos por síntese química, derivam das proteínas internas conservadas do IAV, especificamente a NP, a M1, a PB1 e a PB2 (45). Através de um processo bioinformático, cada sequência de peptídeo foi selecionada com base na presença de epítomos reconhecidos pelas células T e no elevado grau de conservação entre diferentes estirpes de IAV humanas, de aves e suínos (45,46). A ligação do peptídeo a uma cadeia de fluorcarbonetos inerte aumenta o tempo de semivida no organismo, possibilitando uma exposição mais prolongada dos peptídeos ao sistema imunológico e conseqüentemente o possível aumento da imunogenicidade (45).

De modo a determinar a segurança e o carácter imunogénico, a vacina FP-01.1 foi envolvida num ensaio clínico de fase I efetuado em adultos saudáveis com idades compreendidas entre os 18 e os 55 anos. O ensaio incluiu 49 participantes que foram

divididos aleatoriamente em quatro grupos, designadamente o grupo placebo (solução tampão) e três grupos experimentais que receberam a vacina FP-01.I nas doses de 50 µg/peptídeo, 150 µg/peptídeo ou 500 µg/peptídeo, respetivamente. A cada participante foi administrada três vezes por via intramuscular a vacina ou o placebo (45).

A vacina FP-01.I exibiu um perfil de segurança adequado para todas as doses testadas, não se registando efeitos adversos, alterações laboratoriais ou reações no local da administração dependentes da dose. Para além disso, nenhum voluntário revelou reação sistémica ou local significativa após a primeira, a segunda ou a terceira exposição. A máxima imunogenicidade foi verificada após a segunda administração no grupo que recebeu 150 µg/peptídeo (resposta imunológica celular robusta em 75% dos indivíduos, comparativamente a 0% no grupo placebo). Este facto permite concluir que apenas com duas imunizações da vacina é possível induzir uma resposta imunológica robusta. O ensaio revelou ainda que as células T induzidas pela vacina têm potencial para reconhecer diferentes estirpes do IAV (H1N1 e H3N2). Este potencial *cross-reactive* suporta a noção de que a vacina FP-01.I poderá conferir ampla cobertura antigénica (45).

Face aos resultados do ensaio clínico torna-se evidente que a nova plataforma de vacinas de fluorpeptídeos oferece numerosas vantagens, nomeadamente a produção económica em larga escala através de um processo de síntese química, a facilidade de aprovação pelas autoridades regulamentares (perfil de segurança aceitável, ausência de adjuvantes, inexistência de risco de integração ou recombinação genética), a capacidade de promover respostas imunológicas *cross-reactive* das células T e a tecnologia da vacina que suporta repetidas administrações sem desencadear imunidade anti-vetor. É ainda importante salientar que devido ao elevado grau de conservação das proteínas que estão na base da vacina FP-01.I, não há necessidade da sua reformulação face à rápida evolução de estirpes sazonais ou à emergência de um vírus pandémico, podendo ser usada como primeira linha durante os surtos. No contexto da gripe sazonal, a vacina FP-01.I poderia ser usada em combinação com a TIV ou com a vacina quadrivalente, o que desencadearia também uma resposta imunitária contra o IBV e uma imunidade específica de natureza humoral. Esta combinação poderá providenciar uma proteção mais robusta, com particular interesse na população idosa que continua mais vulnerável a infeções pelo IAV mesmo após a vacinação com a TIV (45).

3.4.4 VGX-3400X

VGX-3400X é uma vacina de DNA constituída por plasmídeos que codificam as sequências consenso da HA, NA, M2e e da NP provenientes de múltiplas estirpes do IAV

H5NI aviário (27). Esta vacina entrou num ensaio clínico de fase I que pretendia avaliar a segurança e a imunogenicidade da administração intramuscular de VGX-3400X em três doses distintas (0,6 mg, 2 mg e 6 mg de DNA), seguida de um processo de eletroporação em adultos saudáveis (com idades entre 18 e os 50 anos). A segurança foi verificada pela frequência e severidade de efeitos adversos locais e sistémicos, enquanto a imunogenicidade foi determinada tendo em conta a magnitude de respostas imunológicas mediadas por Abs e por células T contra as proteínas virais. O ensaio clínico já se encontra concluído, no entanto não existem publicações relativas aos seus resultados (47).

Na opinião dos investigadores, a utilização de plasmídeos de DNA que incluem genes de antígenos virais representam uma fórmula promissora para prevenir efetivamente a infeção e a doença causada pelas estirpes aviárias do IAV H5NI. No seu entender, estas vacinas poderão provavelmente induzir uma resposta humoral, como também uma resposta celular de ampla cobertura antigénica, que assume particular importância em situação de variação antigénica da HA e/ou NA. Para além disso, apontam ainda para outras vantagens da utilização de plasmídeos, nomeadamente a facilidade de construção e de produção e os baixos custos que lhe estão associados (47).

No ensaio clínico é ainda testada a eficácia da eletroporação. Esta tecnologia consiste na aplicação de um campo elétrico transmembranar e visa o aumento da absorção dos plasmídeos originado pelo aumento da permeabilidade (criação de poros) das membranas citoplasmáticas (47).

3.4.5 Anticorpos monoclonais

Vários anticorpos monoclonais (mAbs), amplamente protetores, com atividade contra o vírus influenza têm sido isolados, especificamente mAbs anti-haste para o grupo 1 (CR6162; F10; 6F2; KB2), para o grupo 2 (CR8020; CR8043; 9H10; 12D1; 042-100809-2F04; 41-5E04) ou para ambos os grupos da HA (F16; 05-2G02; 81.39a; 39.29/MHAA4549A; MEDI8852; CT-P27; VIS410; CT149). Para além disso foi isolado um mAb que reconhece HAs quer do IAV, quer do IBV (CR9114) e ainda um mAb que liga ao M2e do IAV (TCN-032). Atualmente, alguns dos mAbs anteriormente mencionados já se encontram em ensaios clínicos de fase I ou de fase II e têm demonstrado resultados promissores tanto ao nível da segurança, como de eficácia (7).

Embora a imunização passiva com mAbs possa não ser viável para ser usada amplamente como profilaxia de infeções sazonais ou pandémicas causadas pelo vírus influenza, na medida em que apresenta elevados custos, esta abordagem representa um enorme potencial para tratamento de casos severos de gripe, particularmente infeções

causadas por vírus zoonóticos. Porém, os mAbs podem ter um grande valor profilático para indivíduos vulneráveis (idosos, crianças, grávidas e imunodeprimidos) durante a estação da gripe e para profissionais de saúde durante as pandemias (7).

3.4.5.1 TCN-032

TCN-032 representa um mAb dirigido para o M2e do IAV. Após ter demonstrado a sua segurança (efeitos adversos moderados e não relacionados com TCN-032) no ensaio clínico de fase I, que consistia na administração de uma dose única (1, 3, 10, 20 ou 40 mg/kg) por via intramuscular a adultos saudáveis, o mAb TCN-032 entrou num ensaio clínico de fase II. Este ensaio tinha como finalidade avaliar a segurança e a eficácia do mAb TCN-032 em adultos saudáveis (18-45 anos) após infeção com um IAV (H3N2) (48).

Todos os participantes, após a infeção, receberam uma dose única de 40 mg/kg de TCN-032 ou de placebo por via intravenosa e foram monitorizados para determinados parâmetros, especificamente para os sintomas, disseminação viral e efeitos adversos (segurança). Sete dias após a inoculação do vírus, os voluntários receberam oseltamivir.

Os resultados deste estudo revelam que, dos indivíduos em que foi confirmada a infeção em laboratório, os que foram tratados com TCN-032 apresentaram uma diminuição no score de sintomas e na disseminação viral quando comparado com o grupo placebo, além de que não foi evidente a emergência de vírus resistentes. Embora não se alcançasse o objetivo primário de diminuição da proporção de sintomas de grau superior ou igual a dois ou de pirexia, notavelmente, houve uma tendência para a resolução antecipada e para o abreviamento da duração dos sintomas no grupo que recebeu o mAb. Estes dados permitem concluir que o TCN-032 tem grande potencial para controlo da gripe. É ainda importante salientar que a redução dos sintomas no grupo que recebeu o mAb (35%) é idêntica à relatada para fármacos anti-influenza, como é o caso do oseltamivir (44%) e do peramivir (33%) (48).

No que diz respeito à resposta imunológica contra o vírus inoculado (título de Abs de HAI), observou-se que ambos os grupos apresentam proporções similares na seroconversão, no entanto registou-se um menor número de indivíduos com um título seroprotetivo no grupo do mAb. Estes dados permitem inferir que, quando o TCN-032 é efetivo no controlo da doença, pode desencadear-se uma resposta humoral sistémica menos intensa.

Neste estudo, o TCN-032 apresentou um tempo de semivida aproximadamente de 16 dias (não sendo afetado pela ocorrência da infeção viral) e não foram encontrados Abs anti-TCN-032 (48).

De uma forma geral, o mAb foi seguro, não evidenciando exacerbação imunológica traduzida ao nível das citocinas no soro. Para além disso, não foram registadas preocupações adicionais de segurança quando administrado com o oseltamivir, o que pode significar que a combinação poderá ser utilizada no controlo da doença (48).

Conclusão

Das várias populações mais suscetíveis ao vírus da gripe e ao desenvolvimento de complicações associadas, os idosos assumem particular destaque, pois os vários indicadores demográficos evidenciam uma população mundial cada vez mais envelhecida.

O impacto negativo da gripe a nível individual, na saúde pública e na economia das sociedades, considerando também a tendência demográfica acima descrita, justifica a aposta da comunidade científica numa solução que permita mitigar as fragilidades apontadas às vacinas convencionais, que na atualidade ainda se apresentam como a melhor solução.

O desenvolvimento de uma vacina dita “universal ” não é uma tarefa simples, porém retirar conclusões das tentativas já realizadas e procurar melhorá-las ou até enveredar por novas abordagens, deve fazer parte do caminho a percorrer.

Dados preliminares encontrados em alguns ensaios clínicos consultados parecem indicar maior proteção face ao vírus influenza aquando da administração combinada da TIV com novos candidatos.

Nos vários estudos incluídos nesta monografia não está claramente definido se os candidatos a vacina devem ser projetados para apresentarem uma função terapêutica ou profilática. A capacidade destas abordagens para responder às expectativas anteriormente enunciadas está dependente do(s) alvo(s) selecionado(s) para a sua formulação e da estratégia de vacinação.

A vacina universal não parece ser uma realidade a curto prazo, visto que os ensaios se encontram em fases precoces e, embora se constate a tentativa de uma maior amplitude de cobertura viral, a mesma ainda se encontra distante do objetivo último – a cobertura total.

Mesmo utilizando abordagens que têm como base antigénios virais dotados de epítomos conservados, em última análise tem que ser reconhecida a possibilidade de nunca se alcançar a vacina universal, considerando a diversidade antigénica do vírus influenza (tipos, subtipos e estirpes), bem como a possibilidade real de irem ocorrendo mutações nas proteínas virais.

Referências Bibliográficas

- (1) GASPARINI, R., AMICIZIA, D., LAI, PL., BRAGAZZI, NL., PANATTO, D. – **Compounds with anti-influenza activity: present and future strategies for the optimal treatment and management of influenza. Part I: influenza: influenza life-cycle and currently available drugs.** Journal of Preventive Medicine and Hygiene, 55 (2014) 69-85.
- (2) PREAUD, E., DURAND, L., MACABEO, B., FARKAS, N., SLOESEN, B., PALACHE, A., SHUPO, F., SAMSON, S. – **Annual public health and economic benefits of seasonal influenza vaccination: a European estimate.** BMC Public Health, 14:813 (2014) 1-12.
- (3) ALTENBURG, A., KREIJTZ, J., VRIES, R., SONG, F., FUX, R., RIMMELZWAAN, G., SUTTER, G., VOLZ, A. – **Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) as Production Platform for Vaccines against Influenza and Other Viral Respiratory Diseases.** Viruses, 6:7 (2014) 2735-2761.
- (4) WONG, S., WEBBY, R. – **Traditional and New Influenza Vaccines.** Clinical Microbiology Reviews, 26:3 (2013) 476-492.
- (5) WORLD HEALTH ORGANIZATION – **Pandemic influenza vaccine manufacturing process and timeline.** 2009. [Consultado a 8 de julho de 2017]. Disponível na Internet:
http://www.who.int/csr/disease/swineflu/notes/h1n1_vaccine_20090806/en/index.html
- (6) KRAMMER, F., GARCÍA-SASTRE, A., PALESE, P. – **Is It Possible to Develop a “Universal” Influenza Virus Vaccine? Toward a Universal Influenza Virus Vaccine: Potential Target Antigens and Critical Aspects for Vaccine Development.** Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 9:6 (2017) 028845.
- (7) NACHBAGAUER, R., KRAMMER, F. – **Universal influenza virus vaccine and therapeutic antibodies.** Clinical Microbiology and Infection, 23:4 (2017) 222-228.
- (8) BARBERIS, I., MYLES, P., AULT, S., BRAGAZZI, N., MARTINI, M. – **History and evolution of influenza control through vaccination: from the first monovalent vaccine to universal vaccines.** Journal of Preventive Medicine and Hygiene, 57:3 (2016) 115-120.
- (9) NOGALES, A., SOBRIDO, L. – **Reverse Genetics Approaches for the Development of Influenza Vaccines.** International Journal of Molecular Sciences, 18:1 (2017) E20.

- (10) HAUSE, B., COLLIN, E., LIU, R., HUANG, B., SHENG, Z., LU, W., WANG, D., NELSON, E., LI, F. – **Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine: Proposal for a New Genus in the Orthomyxoviridae Family**. MBio, 5:2 (2014) e00031-14.
- (11) DENG, L., CHO, K., FIERS, W., SAELENS, X. – **M2e-Based Universal Influenza A Vaccines**. Vaccines, 3:1 (2015) 105-136.
- (12) DUCATEZ, M., PELLETIER, C., MEYER, G. – **Influenza D Virus in Cattle, France, 2011-2014**. Emerging Infectious Diseases, 21:2 (2015) 368-371.
- (13) BOUVIER, N., PALESE, P. – **THE BIOLOGY OF INFLUENZA VIRUSES**. Vaccine, 26:Suppl 4 (2008) D49-D53.
- (14) MATROSOVICH, M., MATROSOVICH, T., GRAY, T., ROBERTS, N., KLENK, H. – **Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101:13 (2004) 4620-4624.
- (15) CARRAT, F., FLAHAULT, A. – **Influenza vaccine: The challenge of antigenic drift**. Vaccine, 25:39-40 (2007) 6852-6862.
- (16) WORLD HEALTH ORGANIZATION – **Influenza (Seasonal)**. 2016. [Consultado a 26 de julho de 2017]. Disponível na Internet: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
- (17) CDC – **How Flu Spreads**. 2014. [Consultado a 26 de julho de 2017]. Disponível na Internet: <https://www.cdc.gov/flu/about/disease/spread.htm>
- (18) ISON, M. – **Clinical use of approved influenza antiviral: therapy and prophylaxis**. Influenza and Other Respiratory Viruses, 7:Suppl1 (2013) 7-13.
- (19) DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE – **Vacinação contra a gripe**. 2016. [Consultado a 7 de julho de 2017]. Disponível na Internet: <https://www.ds.pt/em-destaque/vacinacao-contra-a-gripe-20162017.aspx>
- (20) DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE – **Vacinação contra a gripe 2016/2017**. 2016. [Consultado a 7 de julho de 2017]. Disponível na Internet: <https://www.dgs.pt/a-direccao-geral-da-saude/comunicados-e-despachos-do-director-geral/vacinacao-contra-a-gripe-20162017.aspx>

- (21) STEEL, J., LOWEN, A., WANG, T., YONDOLA, M., GAO, Q., HAYE, K., GARCÍA-SASTRE, A., PALESE, P. – **Influenza Virus Vaccine Based on the Conserved Hemagglutinin Stalk Domain**. *MBio*, 1:1 (2010) e00018-10.
- (22) STÖHR, K., BUCHER, D., COLGATE, T., WOOD, J. – **Influenza Virus Surveillance, Vaccine Strain Selection, and Manufacture**. *Methods in Molecular Biology*, 865 (2012) 147-162.
- (23) ANTROBUS, R., LILLIE, P., BERTHOUD, T., SPENCER, A., MCLAREN, J., LADELL, K., LAMBE, T., MILICIC, A., PRICE, D., HILL, A., GILBERT, S. – **A T Cell-Inducing Influenza Vaccine for the Elderly: Safety and Immunogenicity of MVA-NP+MI in Adults Aged over 50 years**. *PLOS ONE*, 7:10 (2012) e48322.
- (24) GROSS, P., ENNIS, F., GAERLAN, P., DENSON, L., DENNING, C., SCHIFFMAN, D. – **A controlled double-blind comparison of reactogenicity, immunogenicity, and protective efficacy of whole-virus and split-product influenza vaccines in children**. *Journal of Infectious Diseases*, 136:5 (1977) 623-632.
- (25) HANNOUN, C., MEGAS, F., PIERCY, J. – **Immunogenicity and protective efficacy of influenza vaccination**. *Virus Research*, 103 (2004) 133-138.
- (26) CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – **Live, Intranasal Influenza VIS**. 2015. [Consultado a 10 de julho de 2017]. Disponível na Internet: <https://www.cdc.gov/vaccines/hcp/vis/vis-statements/flulive.html>
- (27) ZHENG, M., LUO, J., CHEN, Z. – **Development of universal influenza vaccines based on influenza M e NP genes**. *Infection*, 42:2 (2014) 251-262.
- (28) KRAMMER, F., PALESE, P. – **Influenza virus hemagglutinin stalk-based antibodies and vaccines**. *Current Opinion in Virology*, 3:5 (2013) 521-530.
- (29) KRAMMER, F., PICA, N., HAI, R., MARGINE, I., PALESE, P. – **Chimeric Hemagglutinin Influenza Virus Vaccine Constructs Elicit Broadly Protective Stalk-Specific Antibodies**. *Journal of Virology*, 87:12 (2013) 6542-6550.
- (30) KOLPE, A., SCHEPENS, B., FIERS, W., SAELENS, X. – **M2-based influenza vaccines: recent advances and clinical potential**. *Expert Review of Vaccines*, 16:2 (2017) 123-136.
- (31) NEIRYNCK, S., DEROO, T., SAELENS, X., VANLANDSCHOOT, P., JOU, W., FIERS, W. – **A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein**. *Nature Medicine*, 5:10 (1999) 1157-1163.

- (32) CLINICALTRIALS.GOV – **Safety Study of Recombinant M2e Influenza-A Vaccine in Healthy Adults (FLU-A)**. 2012. [Consultado a 9 de julho de 2017]. Disponível na Internet:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00819013?term=NCT00819013&rank=1>
- (33) TURLEY, C., RUPP, R., JOHNSON, C., TAYLOR, D., WOLFSON, J., TUSSEY, L., KAVITA, U., STANBERRY, L., SHAW, A. – **Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2.4×M2e) en healthy adults**. *Vaccine*, 29:32 (2011) 5145-5152.
- (34) TALBOT, H., ROCK, M., JOHNSON, C., TUSSEY, L., KAVITA, U., SHANKER, A., SHAW, A., TAYLOR, D. – **Immunopotential of Trivalent Influenza Vaccine When Given with VAXI02, a Recombinant Influenza M2e Vaccine Fused to the TLR5 Ligand Flagellin**. *PLOS ONE*, 5:12 (2010) e14442.
- (35) BERTHOUD, T., HAMILL, M., LILLIE, P., HWENDA, L., COLLINS, K., EWER, K., MILICIC, A., POYNTZ, H., LAMBE, T., FLETCHER, H., HILL, A., GILBERT, S. – **Potent CD8⁺ T-Cell Immunogenicity in Humans of a Novel Heterosubtypic Influenza A Vaccine, MVA-NP+MI**. *Clinical Infectious Diseases*, 52:1 (2011) 1-7.
- (36) ANTROBUS, R., BERTHOUD, T., MULLARKEY, C., HOSCHLER, K., COUGHLAN, L., ZAMBON, M., HILL, A., GILBERT, S. – **Coadministration of Seasonal Influenza Vaccine and MVA-NP+MISimultaneously Achieves Potent Humoral and Cell-Mediated Responses**. *Molecular Therapy*, 22:1 (2014) 233-238.
- (37) LILLIE, P., BERTHOUD, T., POWELL, T., LAMBE, T., MULLARKEY, C., SPENCER, A., HAMILL, M., PENG, Y., BLAIS, ME., DUNCAN, C., SHEEHY, S., HAVELOCK, T., FAUST, S., WILLIAMS, R., GILBERT, A., OXFORD, J., DONG, T., HILL, A., GILBERT, S. – **Preliminary Assessment of the Efficacy of a T-Cell-Based Influenza Vaccine, MVA-NP+M, in humans**. *Clinical Infectious Diseases*, 55:1 (2012) 19-25.
- (38) WORLD HEALTH ORGANIZATION – **Recommendations for Influenza Vaccine Composition**. 2006. [Consultado a 31 de julho de 2017]. Disponível na Internet:
<http://www.who.int/influenza/vaccines/vaccinerecommendations1/en/index7.html>
- (39) ATSMON, J., KATE-ILOVITZ, E., SHAIKEVICH, D., SINGER, Y., VOLOKHOV, I., HAIM, K., BEN-YEDIDIA, T. – **Safety and Immunogenicity of Multimeric-001 – a Novel Universal Influenza Vaccine**. *Journal of Clinical Immunology*, 32:3 (2012) 595-603.

- (40) ATSMON, J., CARACO, Y., ZIV-SEFER, S., SHAIKEVICH, D., ABRAMOV, E., VOLOKHOV, I., BRUZIL, S., HAIMA, K., GOTTLIEB, T. – **Priming by a novel universal influenza vaccine (Multimeric-001) – A gateway for improving immune response in the elderly population.** *Vaccine*, 32:44 (2014) 5816-5823.
- (41) PLEGUEZUELOS, O., ROBINSON, S., STOLOFF, G., CARRAPÓS-WANDERLEY, W. – **Synthetic Influenza vaccine (FLU-v) stimulates cell mediated immunity in a double-blind, randomised, placebo-controlled Phase I trial.** *Vaccine*, 30:31 (2012) 4655-4660.
- (42) CLINICALTRIALS.GOV – **Phase Ib Influenza Vaccine Study in Healthy Subjects.** 2010. [Consultado a 15 de julho de 2017]. Disponível na Internet: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01181336?term=nct01181336&rank=1>
- (43) PLEGUEZUELOS, O., ROBINSON, S., FERNÁNDEZ, A., STOLOFF, G., MANN, A., GILBERT, A., BALARATNAM, G., WILKINSON, T., LAMBKIN-WILLIAMS, R., OXFORD, J., CARRAPÓS-WANDERLEY, W. – **A Synthetic Influenza Virus Vaccine Induces a Cellular Immune Response that Correlates with Reduction in Symptomatology and Virus Shedding in a Randomised Phase Ib Live-Virus Challenge in Humans.** *Clinical and Vaccine Immunology*, 22:7 (2015) 828-835.
- (44) DOORN, E., PLEGUEZUELOS, O., LIU, H. FERNÁNDEZ, A., BANNISTER, R., STOLOFF, G., OFTUNG, F., NORLEY, S., HUCKRIEDE, A., FRIJLINK, H., HAK, E. – **Evaluation of the immunogenicity and safety of different doses and formulations of a broad spectrum influenza vaccine (FLU-v) developed by SEEK: study protocol for a single-center, randomised, double-blind and placebo-controlled clinical phase IIb trial.** *BMC Infectious Diseases*, 17:1 (2017) 241.
- (45) FRANCIS, J., BUNCE, C., HORLOCK, C., WATSON, J., WARRINGTON, S., GEORGES, B., BROWN, C. – **A novel peptide-based pan-influenza A vaccine: A double blind, randomised clinical trial of immunogenicity and safety.** *Vaccine*, 33:2 (2015) 396-402.
- (46) CLINICALTRIALS.GOV – **A Study to Evaluate the Safety, Tolerability and Immunogenicity of a Universal Influenza A Vaccine.** 2012. [Consultado a 17 de julho de 2017]. Disponível na Internet: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01265914?term=nct01265914&rank=1>

(47) CLINICALTRIALS.GOV – **Study of VGX-3400X, H5NI Avian Influenza Virus DNA Plasmid + Electroporation in Healthy Adults**. 2012. [Consultado a 17 de julho de 2017]. Disponível na Internet:

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01142362?term=nct01142362&rank=1>

(48) RAMOS, E., MITCHAM, J., KOLLER, T., BONAVIA, A., USNER, D., BALARATNAM, G., FREDLUND, P., SWIDEREK, K. – **Efficacy and Safety of Treatment With an Anti-M2e Monoclonal Antibody in Experimental Human Influenza**. *The Journal of Infectious Diseases*, 211:7 (2015) 1038-1044.

