

Sara Andreia Zuzarte Cardoso

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “MicroRNAs e HDLs: Alvos Promissores na Terapêutica das Doenças Cardiovasculares?” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, do Dr. Pedro Baptista, da Dra. Liliana Teles e da Professora Doutora Leonor Almeida 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

Sara Andreia Zuzarte Cardoso

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “MicroRNAs e HDLs: Alvos Promissores na Terapêutica das Doenças Cardiovasculares?” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, do Dr. Pedro Baptista, da Dra. Liliana Teles e da Professora Doutora Leonor Almeida 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, Sara Andreia Zuzarte Cardoso, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2012146138, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “MicroRNAs e HDLs: Alvos Promissores na Terapêutica das Doenças Cardiovasculares?” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio.

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

Coimbra, 13 de setembro de 2017

Sara Andreia Zuzarte Cardoso

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Pedro Batista, o meu especial agradecimento pela oportunidade de estagiar na Farmácia Santa Cruz e por todos os conhecimentos transmitidos, pela confiança e pela forma como me acolheu.

A toda a equipa da Farmácia Santa Cruz, um enorme obrigada por todos os conhecimentos, toda a ajuda, toda a disponibilidade, por terem sido sempre um exemplo a seguir, pela maneira como me acolheram na equipa, e por toda a amizade e pelo carinho: Jani, Isa, Ana, Tiago Carvalho e Tiago Bento, um ENORME obrigada!

À Dra. Liliana Teles e a toda a equipa da Pharmilab, pela oportunidade do estágio, pela forma simpática como me acolheram, e por se terem demonstrado totalmente disponíveis para as minhas (imensas) dúvidas, pela orientação, pelo carinho e amizade.

À Professora Doutora Leonor Almeida, um agradecimento muito especial, por toda a ajuda, por todos os conselhos, pela paciência, por toda a tranquilidade transmitida, e pela enorme disponibilidade.

À minha família, em especial aos meus pais e irmãos, e ao meu namorado por toda a paciência, por todo o apoio incondicional e carinho!

Às minhas amigas, que me acompanharam ao longo do curso. Muito obrigada por todo o apoio, amizade e por estarem sempre presentes!

RESUMO – RELATÓRIOS DE ESTÁGIO.....	VI
ABSTRACT – INTERNSHIP REPORT	VI
RESUMO – MONOGRAFIA.....	VII
ABSTRACT	VIII
PARTE A - RELATÓRIO ESTÁGIO CURRICULAR EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA - SANTA CRUZ	
INTRODUÇÃO	2
ANÁLISE SWOT	3
PONTOS FORTES.....	4
PONTOS FRACOS.....	7
OPORTUNIDADES.....	8
AMEAÇAS	9
CONCLUSÃO.....	10
ANEXO A – CASOS CLÍNICOS.....	11
PARTE B - RELATÓRIO ESTÁGIO CURRICULAR EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA - PHARMILAB	
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
INTRODUÇÃO	14
ANÁLISE SWOT	15
PONTOS FORTES.....	16
PONTOS FRACOS.....	19
OPORTUNIDADES.....	20
AMEAÇAS	21
CONCLUSÃO.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
PARTE C - MICRORNAS E HDLS: ALVOS PROMISSORES NA TERAPÊUTICA DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES?	
LISTA DE ABREVIATURAS.....	24
1. INTRODUÇÃO	26
2. ATROSCLEROSE: FISIOPATOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO DA PLACA ATROSCLERÓTICA.....	27
3. AS HDL E O PAPEL NA PREVENÇÃO DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	31
A composição das HDL	31

As HDL e o transporte reverso de colesterol	32
Outras propriedades ateroprotetoras das HDL	33
4. AS HDL COMO ALVO TERAPÊUTICO	35
O fracasso das terapias recentes no aumento de HDL-C	35
O conceito de HDL (dis)funcionais	37
5. OS MICRORNAS E O METABOLISMO DAS HDL	37
A relevância da família miR-33	40
6. ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS BASEADAS NA MANIPULAÇÃO DE MIRNAS	42
Inibição da função de miRNAs	42
Reposição dos níveis de miRNA	44
7. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

RESUMO – RELATÓRIOS DE ESTÁGIO

O estágio curricular no âmbito do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas vem, como a última etapa do nosso percurso académico, representar o nosso primeiro contacto com a realidade profissional, na qual todos os nossos conhecimentos adquiridos na faculdade são consolidados, dando-nos a oportunidade de contactar com a realidade farmacêutica. Ao colocar os nossos conhecimentos em prática e ao desenvolvermos novas competências, permite-nos adquirir a experiência profissional necessária para futuramente integrarmos o mundo de trabalho. Para além do estágio curricular em Farmácia Comunitária, tive também a oportunidade de realizar um estágio em Indústria Farmacêutica. Os presentes relatórios têm como objetivo descrever esta experiência, através uma avaliação do meu desempenho sob a forma de análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), a qual me permitiu identificar quais os pontos fortes, pontos fracos, bem como as oportunidades e ameaças sentidas ao longo do meu estágio.

Palavras-chave: Relatório, Estágio Curricular, Farmácia Comunitária, Indústria Farmacêutica, Análise SWOT.

ABSTRACT – INTERNSHIP REPORT

The curricular internship as part of the Integrated Master's Degree in Pharmaceutical Sciences, as the last stage of our academic course, represents our first contact with the professional reality, in which all our acquired knowledge is consolidated, giving us the opportunity to contact with the pharmaceutical reality. By applying our knowledge and by developing our skills, the curricular internship allows us to acquire the necessary professional experience to integrate world of work in the future. Besides the curricular internship in Community Pharmacy, I also had the opportunity to perform an internship in Pharmaceutical Industry. The purpose of these reports is to describe this experience through an evaluation of my performance under the SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*) analysis model, which allowed me to identify the strengths, weaknesses, opportunities and threats throughout my internship.

Key-words: Report, Curricular Internship, Community Pharmacy, Pharmaceutical Industry, SWOT analysis.

A aterosclerose consiste numa doença inflamatória crónica da parede arterial, caracterizada pela acumulação subendotelial de colesterol associado a lipoproteínas de baixa densidade (LDL), com a conseqüente formação de placas ateroscleróticas. A aterosclerose e as suas complicações clínicas são as principais causas de morbidade e mortalidade nos países desenvolvidos, e, deste modo, a prevenção e o tratamento das doenças cardiovasculares (DCV) tornam-se cruciais. Vários estudos epidemiológicos comprovaram a relação inversa entre o colesterol associado às lipoproteínas de alta densidade (HDL-C) e o risco de desenvolvimento da doença cardiovascular. De facto, as HDL desempenham um papel fundamental na prevenção da aterosclerose devido à sua ação ateroprotetora, fundamentalmente através da sua ação no transporte reverso de colesterol (RCT). No entanto, várias tentativas terapêuticas para aumentar a concentração do HDL-C falharam em demonstrar a redução do risco cardiovascular, sugerindo que a composição e funcionalidade das HDL se mostra mais importante do que a concentração de HDL-C para a proteção contra a aterosclerose. Deste modo, têm sido desenvolvidos vários estudos que procuram compreender os mecanismos que regulam não só os teores plasmáticos das HDL como também as suas funções. Neste âmbito, os microRNAs (miRNAs) têm sido reportados como agentes que controlam a concentração e a funcionalidade das HDL. Os miRNAs consistem em *small RNAs* não codificantes que regulam a expressão génica pós-transcricional, encontrando-se envolvidos em vários processos biológicos e doenças. De facto, tem-se verificado que diversos miRNAs se encontram alterados em várias doenças, nomeadamente na DCV. Além disso, os miRNAs, nomeadamente os miR-33a/b, têm demonstrado desempenhar um papel importante na regulação de redes génicas envolvidas em várias etapas do RCT, como a biogénese das HDL, o efluxo de colesterol e a captação hepática de colesterol. Foi também demonstrado que as HDL transportam consigo miRNAs, que podem ser posteriormente entregues às células dos tecidos periféricos e aqui regularem igualmente redes de genes envolvidas na formação e progressão da placa aterosclerótica. Devido à sua capacidade de regulação de genes envolvidos em várias etapas do metabolismo e da funcionalidade das HDL, e da promoção do transporte reverso de colesterol, os miRNAs apresentam-se como potenciais alvos terapêuticos para o tratamento e prevenção das DCV.

Palavras-chave: Aterosclerose; Lipoproteínas de Alta Densidade; HDLs funcionais, miRNA, miR-33a/b.

ABSTRACT

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease of the arterial wall, characterized by subendothelial accumulation of low-density lipoprotein cholesterol (LDL), with the consequent formation of atherosclerotic plaques. Atherosclerosis and its clinical complications are the main causes of morbidity and mortality in developed countries, thus, the prevention and treatment of cardiovascular diseases become crucial. Several epidemiologic studies have demonstrated the inverse relationship between high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and the risk of developing cardiovascular disease. Indeed, HDL plays a fundamental role in the prevention of atherosclerosis due to its atheroprotective function, mainly through its activity involved in reverse cholesterol transport (RCT). Subsequently, several therapeutic attempts to increase HDL-C concentration failed to demonstrate the reduction of cardiovascular risk, suggesting that the HDL composition and its functionality are more important factors for protection against atherosclerosis than the HDL-C concentration. Therefore, several studies have been developed to understand the mechanisms underlying the regulation of plasma HDL levels, as well as their functions. These studies have shown that microRNAs (miRNAs) control the HDL concentration and its functionality. These agents are small non-coding RNAs (sRNA) that regulate post-transcriptional gene expression, and they are involved in various biological processes and diseases. It has been reported that several miRNAs are altered in several diseases, namely in CVD. Additionally, miRNAs, particularly miR-33a/b, have been shown to play an important role in regulating several gene networks involved in several stages of RCT, such as HDL biogenesis, cholesterol efflux and hepatic cholesterol uptake. It has also been reported that HDLs carry miRNAs, which can subsequently be delivered to peripheral tissue cells and also regulate several gene networks involved in atherosclerotic plaque formation and progression. Due to its ability to regulate several genes involved in various steps of HDL metabolism and functionality and RCT promotion, miRNAs are potential therapeutic targets for DCV treatment and prevention.

Key words: Atherosclerosis; High-Density Lipoproteins; Functional HDL; miRNA; miR-33a/b.

PARTE A

RELATÓRIO ESTÁGIO CURRICULAR EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA – FARMÁCIA SANTA CRUZ

INTRODUÇÃO

O farmacêutico, como agente de saúde pública e especialista do medicamento, possui aptidões que o permitem executar todas as ações respeitantes ao medicamento. O farmacêutico tem competências para aconselhar e dispensar medicamentos, tendo em conta as suas indicações terapêuticas, contraindicações, interações medicamento-medicamento e/ou medicamento-alimento, reações adversas bem como aconselhar e dispensar produtos de uso veterinário, produtos cosméticos e de higiene, dispositivos médicos e ainda prestar serviços farmacêuticos.

Após cinco anos de formação técnica e científica focada no medicamento, o estágio curricular em Farmácia Comunitária, no âmbito do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, como etapa do nosso percurso académico de extrema importância, vem culminar e consolidar todos os conhecimentos adquiridos, permitindo-nos contactar com a realidade farmacêutica, ao colocar em prática todos os nossos conhecimentos durante o contacto com os utentes, e adquirir a experiência profissional necessária, para que, futuramente possamos integrar uma equipa de trabalho.

A farmácia comunitária é, muitas vezes, o primeiro local de contacto entre o utente e um profissional de saúde qualificado, no qual os Farmacêuticos assumem um papel importante, e, portanto, necessitam de ser capazes de se adaptar à mudança e de responder de forma eficaz às mais variadas necessidades dos utentes. Desta forma, a farmácia deve ser uma entidade prestadora de um conjunto de serviços de saúde cada vez mais diferenciados e especializados.

O Farmacêutico assume a grande responsabilidade de criar uma ligação de proximidade com o utente, de modo a que possa atuar como um profissional de saúde qualificado, transmitindo confiança e conhecimento, mostrando-se disponível para ouvir o utente e outros profissionais de saúde, com o principal objetivo de promover uso racional do medicamento.

Foi com grandes expectativas que escolhi a Farmácia Santa Cruz, em Coimbra, para realizar o meu estágio curricular, que decorreu entre o dia 09 de janeiro e o dia 24 de abril de 2017, sob orientação do Dr. Pedro Baptista.

Com este relatório pretendo descrever esta experiência, sumariando as atividades desenvolvidas, os conhecimentos e aptidões adquiridas ao longo do estágio. Esta descrição encontra-se sob a forma de uma análise SWOT (*Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*).

ANÁLISE SWOT

De modo a descrever melhor o meu estágio curricular na Farmácia Santa Cruz e realizar uma avaliação crítica do mesmo, realizei uma análise SWOT (*Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*) com o intuito de sistematizar e relacionar os pontos fortes e fracos, bem as oportunidades e ameaças inerentes ao estágio.

Tabela I – Análise SWOT do estágio na Farmácia Santa Cruz.

	Positivos	Negativos
Análise interna	<p><u>Pontos Fortes</u></p> <ul style="list-style-type: none"> × Possibilidade de aplicar na prática os conhecimentos adquiridos ao longo do MICF × Boa receção e integração na equipa da farmácia × Espírito de entreaajuda entre todos os elementos × Estágio dividido em fases × Armazenamento e Organização × Serviços farmacêuticos × Potencialidades do Sifarma2000® × Atendimento ao público × Heterogeneidade de utentes × Utentes fidelizados 	<p><u>Pontos Fracos</u></p> <ul style="list-style-type: none"> × Dificuldade inicial no aconselhamento de produtos cosméticos e de dermofarmácia × Preparação de medicamentos manipulados × Alguma dificuldade inicial em associar o nome comercial do medicamento à respetiva substância ativa × Processamento de receitas e faturação × Maioria dos utentes da mesma faixa etária
Análise externa	<p><u>Oportunidades</u></p> <ul style="list-style-type: none"> × Possibilidade de frequentar formações × Contacto com outros profissionais de saúde × Receitas eletrónicas desmaterializadas e materializadas 	<p><u>Ameaças</u></p> <ul style="list-style-type: none"> × O facto de ser estagiária × Receitas manuais

PONTOS FORTES

1. Possibilidade de aplicar na prática os conhecimentos adquiridos

O nosso curso proporciona-nos um vasto conhecimento científico na área da saúde, no entanto, a nossa formação como Farmacêuticos não se resume apenas ao percurso académico; Sem dúvida que constitui uma base sólida de conhecimentos, que, em conjunto com a prática profissional cumulativa, nos permite adquirir competências essenciais para o desempenho eficiente intrínseco à nossa profissão.

Como futura Farmacêutica, a oportunidade de transpor todo o conhecimento teórico para a prática real, e de sentir que a formação recebida contribuiu de modo positivo para o bem-estar de todos os utentes com os quais contactei, foi imensamente gratificante.

2. Boa receção e integração na equipa da farmácia

A Farmácia Santa Cruz é constituída por uma equipa de seis farmacêuticos, jovem e dinâmica. Desde o primeiro dia que me acolheram com grande empatia, mostrando-se sempre disponíveis para me ajudar e esclarecer todas as minhas dúvidas. Sem dúvida, foi um dos aspetos mais positivos durante todo o meu estágio, no qual me senti parte da equipa logo desde o início.

3. Espírito de entreatajuda entre todos os elementos

É de se notar a grande envolvência entre todos os colaboradores da Farmácia, salientando a grande entreatajuda, companheirismo e amizade.

Ao longo do estágio fui reconhecendo a importância do espírito de equipa num local de trabalho. O ambiente de entreatajuda, a amizade e a divisão de tarefas entre colegas, não só é importante para o sucesso, como também para o bem-estar pessoal no local de trabalho, influenciando de modo positivo o desempenho das funções de cada um.

4. Estágio dividido em fases

O meu estágio foi dividido particularmente em duas fases: numa fase inicial no *BackOffice*, e posteriormente no atendimento ao balcão.

O trabalho de *BackOffice* é fundamental para o bom funcionamento da Farmácia, sendo essencial uma boa organização dos produtos e do espaço. Considero que a fase de *BackOffice*

é crucial para aprender e reconhecer a importância de uma boa gestão de encomendas e devoluções, controlo dos prazos de validade e estabelecer margens de lucro. Durante este estágio tive a possibilidade de acompanhar várias tarefas, como a recolha regular dos dados dos termohigrómetros, e observar como era feito o atendimento, de modo a que o cliente ficasse satisfeito com o serviço prestado.

5. Armazenamento e organização

Devido à grande diversidade de produtos, são determinantes a boa organização e o correto armazenamento de todos os produtos dentro da farmácia, não só para manter a sua qualidade, como também para facilitar o bom funcionamento da farmácia e do atendimento ao público, já que, para os utentes a rapidez do atendimento é um fator positivo importante.

O tempo que passei no armazém foi importante para aprender como os produtos eram organizados e onde eram arrumados, e familiarizar-me com os nomes comerciais, o que contribuiu para uma melhor capacidade de atendimento e maior confiança posteriormente na fase de atendimento ao balcão, uma vez que já conhecia grande parte dos produtos existentes na farmácia e onde se encontravam arrumados.

6. Serviços farmacêuticos

Os serviços prestados pelas Farmácias atualmente vão muito mais além da dispensa de medicamentos e outros produtos, tendo evoluído na prestação de serviços de saúde, nomeadamente na determinação de parâmetros bioquímicos, particularmente na medição dos níveis de glicémia, colesterol, triglicéridos e pressão arterial.

Logo desde o início do meu estágio que tive oportunidade de prestar estes serviços, e assim o contacto com os utentes foi acontecendo de forma gradual e progressiva, que contribuiu para a adaptação aos vários tipos de clientes, e assim aumentando a minha confiança nos aconselhamentos e durante os atendimentos.

7. Potencialidades do *Sifarma2000*[®]

A Farmácia Santa Cruz possui o sistema informático *Sifarma2000*[®]. A adaptação ao programa foi fácil, uma vez que já tinha tido a oportunidade de contactar com o programa durante um estágio de verão em Farmácia Comunitária, e, portanto, já conhecia algumas funcionalidades do programa. Os primeiros dias do estágio curricular foram importantes para relembrar onde se encontravam estas funcionalidades.

Como estagiária, considero o programa uma ferramenta muito útil para o meu desempenho durante todo o estágio, uma vez que, para além de intuitiva, permite obter toda a informação científica sobre medicamentos e/ou produtos, bem como informação relevante sobre os utentes, como por exemplo a medicação crónica habitual, traduzindo-se num atendimento mais completo e personalizado.

8. Atendimento ao público

A dispensa de medicamentos e outros produtos é uma das atividades de maior importância em Farmácia Comunitária. Durante a cedência o Farmacêutico é responsável pela disponibilização de toda a informação necessária, garantindo a boa utilização e o uso racional do medicamento.

O grande desafio, para além de ultrapassar o receio de errar e a insegurança, assentou na necessidade de realizar várias tarefas simultaneamente, tais como, avaliar a receita, fazer perguntas oportunas ou procurar informação no sistema, se necessário, ceder todos os produtos corretamente, conversar com o utente, aconselhá-lo e fornecer as respetivas informações de utilização necessárias, tendo em conta a duração de atendimento, para que o utente não tivesse que aguardar muito tempo.

Ao longo do estágio os desafios foram superados, a transmissão de segurança foi essencial para que a confiança fosse aumentando e a relação com os utentes fosse sendo cada vez maior e melhor.

9. Heterogeneidade de utentes

A Farmácia Santa Cruz situa-se na baixa de Coimbra, mais propriamente na Rua das Padeiras. Devido à proximidade de centros turísticos, zonas de lazer, serviços e terminais de transportes públicos, permite uma enorme afluência de uma grande heterogeneidade de utentes, incluídos em diversos escalões etários e contextos socioculturais e socioeconómicos.

Ao longo do estágio tive a oportunidade de realizar alguns atendimentos a utentes turistas/estrangeiros, o que exigiu um atendimento especial, e o domínio de outras línguas. Assim, a heterogeneidade dos utentes revelou-se numa necessidade de adaptar o atendimento a cada utente, e permitiu o meu crescimento profissional e desenvolvimento da componente social associada à profissão farmacêutica.

10. Utentes fidelizados

A Farmácia Santa Cruz dispõe de vários clientes fidelizados, o que, enquanto estagiária, facilitou o meu atendimento ao público, uma vez que grande parte dos utentes são polimedicados, e como é mantido um registo da sua medicação crónica, conseguia dispensar ao utente, na maioria das vezes, o medicamento que o utente habitualmente adquire, apesar da grande diversidade de produtos e laboratórios, contribuindo assim para a satisfação do utente.

PONTOS FRACOS

1. Dificuldade inicial no aconselhamento de produtos cosméticos e de dermofarmácia

A Farmácia Santa Cruz possui uma gama variada de produtos cosméticos e da área de dermofarmácia, e apesar das diferentes marcas possuírem substâncias com propriedades idênticas, a extensa diversidade de produtos criou alguma dificuldade no aconselhamento deste tipo de produtos, bem como responder às questões e dúvidas dos utentes.

Ao longo do estágio, para além das explicações sobre cada gama de produtos, formações anteriores, experiência pessoal e do dia-a-dia, e o *feedback* dos utentes, tive a possibilidade de frequentar formações sobre produtos cosméticos, o que contribuiu para que a dificuldade inicial sentida no aconselhamento destes produtos fosse sendo ultrapassada.

2. Preparação de medicamentos manipulados

Apesar de durante o estágio curricular não ter tido a oportunidade de preparar medicamentos manipulados, devido à falta de condições da Farmácia, nomeadamente de espaço que permita a preparação deste tipo de medicamentos, ao longo do meu percurso académico foram várias as ocasiões em que me foi possível preparar estes medicamentos. Contudo, durante o estágio curricular, tive a oportunidade de realizar preparações extemporâneas de suspensões orais de antibióticos.

3. Alguma dificuldade inicial em associar o nome comercial à respetiva substância ativa

Quando iniciei o estágio, apesar de já conhecer alguns nomes comerciais, senti alguma dificuldade em associar as substâncias ativas ao nome comercial do respetivo medicamento. Uma vez que o conhecimento dos nomes comerciais se adquire com a experiência profissional,

neste sentido o estágio curricular torna-se importante, permitindo-nos o contacto com medicamentos dos mais diversos laboratórios e com os mais variados nomes comerciais.

4. Processamento de receitas e faturação

Apesar de atualmente a grande maioria das receitas serem eletrónicas desmaterializadas, parte das receitas que chegam à farmácia ainda são manuais ou eletrónicas materializadas. O processamento de receitas e faturação, uma das muitas tarefas desempenhadas pelo Farmacêutico em Farmácia Comunitária, consiste num processo complexo, minucioso, exigente e rigoroso, de modo a minimizar os erros de receituário ou de dispensa da medicação.

Durante o período de estágio não tive a oportunidade de efetuar a análise das receitas, constituindo um ponto fraco no estágio. No entanto, foi-me explicado o modo de avaliação e deram-me oportunidade, não só de acompanhar a equipa nesta tarefa, como também de analisar uma ou outra receita, cujos erros passavam facilmente despercebidos.

5. Maioria dos utentes da mesma faixa etária

Apesar da heterogeneidade de utentes mencionada acima, grande parte dos utentes da Farmácia habitam na zona da baixa da cidade, sendo, portanto, uma população maioritariamente idosa e polimedicada, o que resulta na procura de medicamentos muito semelhantes.

Na minha opinião como estagiária, inicialmente mostra-se uma vantagem, uma vez que o aconselhamento e os cuidados no atendimento são idênticos. Porém, ao fim de algum tempo, torna o atendimento muito sistematizado, para além de que não tive oportunidade de dispensar e/ou aconselhar certos medicamentos, considerando, assim, que tenha sido um ponto fraco.

OPORTUNIDADES

I. Possibilidade de frequentar formações

Como já referi anteriormente, durante o estágio tive a oportunidade de frequentar formações sobre produtos cosméticos e da área de dermofarmácia. Estas formações externas à farmácia constituíram uma grande vantagem para o meu estágio, uma vez que pude conhecer de forma mais ou menos detalhada toda ou parte da gama de produtos de determinados laboratórios,

o que me permitiu adquirir conhecimentos essenciais para o meu desempenho no aconselhamento destes produtos e/ou de produtos semelhantes.

2. Contacto com outros profissionais de saúde

O Farmacêutico, como especialista do medicamento, durante a sua atividade, torna-se determinante a colaboração com todos os profissionais de saúde. Durante o estágio tive a oportunidade de contactar com outros profissionais de saúde, nomeadamente médicos, com a finalidade de esclarecer questões relacionadas com prescrições.

3. Contacto com receitas eletrónicas desmaterializadas e materializadas

A sociedade rapidamente se adaptou às receitas eletrónicas desmaterializadas; quando alguns utentes traziam consigo receitas manuais ou eletrónicas materializadas era necessário alertar o utente para alguns aspetos, como o facto de que todos os medicamentos teriam de ser dispensados e que não podia ser dispensado apenas o que necessitava e voltar mais tarde com a mesma receita para lhe serem dispensados os restantes medicamentos, criando alguma confusão em determinados utentes.

Assim, durante o estágio tive oportunidade de contactar, maioritariamente, com receitas eletrónicas desmaterializadas, mas também com algumas materializadas e manuais; o método de seleção dos medicamentos entre elas é diferente, proporcionando-me uma experiência mais ampla na dispensa de medicamentos mediante apresentação de receita médica.

AMEAÇAS

I. O facto de ser estagiária

O Farmacêutico é um profissional de saúde, tornando-se essencial estabelecer uma relação de confiança com o utente, adaptando o atendimento a cada um. Na Farmácia Santa Cruz, grande parte dos utentes conhece a equipa de farmacêuticos, e estão, por isso, mais familiarizados com o seu atendimento, bem como a equipa adaptada ao utente.

No início do estágio constatei que alguns clientes demonstraram alguma resistência inicial por serem atendidos por um elemento novo na Farmácia, tornando-se poucos recetivos, e muitas vezes pediam para serem atendidos por um dos Farmacêuticos, uma vez que “já sabem qual é a minha medicação”; outros não se mostravam incomodados, mostrando-se até bastante recetivos e compreensivos.

Conquistar a confiança e estabelecer relações com os utentes foi um desafio, que foi bem superado ao longo do estágio, e os receios iniciais deram lugar à confiança nas minhas competências.

2. Receitas manuais

Cada vez são menos as receitas manuais que chegam à Farmácia. Ainda assim, durante o meu estágio contactei com algumas, o que não se mostrou ser uma tarefa fácil, principalmente em entender a prescrição dada a caligrafia, que muitas vezes era impercetível. Muitas vezes necessitei de ir confirmar com outro Farmacêutico a prescrição para que não ocorressem erros de dispensa da medicação.

CONCLUSÃO

O estágio curricular em Farmácia Comunitária representa o nosso primeiro contacto com os utentes e permite-nos reconhecer a importância do farmacêutico na sociedade, revelando-se, por isso, uma grande oportunidade para o meu crescimento profissional e pessoal.

O farmacêutico deve focar toda a sua atividade na saúde e bem-estar do utente, de modo a que o tratamento seja conseguido com segurança, qualidade e eficácia. Desta forma, considero que o meu estágio na Farmácia Santa Cruz foi bastante enriquecedor, uma vez que me permitiu contactar com uma grande variedade de utentes e em diferentes situações, dando-me a oportunidade de consolidar e aplicar os meus conhecimentos através do aconselhamento, acompanhamento, dedicação e atenção dada aos utentes.

Como futura Farmacêutica foi incentivador a aproximação com a realidade profissional e encorajador constatar que a intervenção do Farmacêutico, apesar de muitas das vezes ser subvalorizada, é reconhecida pela sociedade através da confiança que os utentes depositam no Farmacêutico, esperando sempre o melhor aconselhamento.

Com este estágio pude desenvolver a vertente humana da profissão e ganhar uma nova perspectiva sobre o Farmacêutico, permitindo-me perceber a envolvência, abrangência, importância do Farmacêutico, sempre com consciência de que é necessária uma constante aprendizagem e que o trabalho em equipa é a base do caminho para o sucesso.

ANEXO A – CASOS CLÍNICOS

CASO CLÍNICO 1

Jovem do sexo feminino, 20 anos, queixa-se de sensação de formiguelo latejante no lábio

Após algumas questões, percebeu-se que a utente tinha histórico de herpes labial, e que a sensação no lábio seria um episódio de herpes labial. Nesta situação, foi-lhe cedido Zovirax[®] e aconselhada a colocação 5 vezes ao dia no lábio, até à supressão completa do herpes.

CASO CLÍNICO 2

Senhor, 30 anos, refere que anda com episódios de tosse desde o dia anterior

Quando questionado, refere que não faz nenhuma medicação e que não é diabético. Menciona ainda que a tosse apresenta expetoração, e é acompanhada de dores de garganta. Neste caso, foi aconselhada a toma de 5mL, 3 vezes ao dia, até um máximo de 7 dias, de Bisolvon[®] xarope, uma vez que preferia esta formulação. Para a dor de garganta, foram recomendadas umas pastilhas Streptfen[®], a cada 6 horas, não excedendo os 3 dias. Para além disto, foi-lhe relembrada a importância de uma boa hidratação de modo a facilitar a libertação e expulsão da expetoração.

CASO CLÍNICO 3

Senhor, 50 anos, queixa-se de sangramento gengival

Quando questionado, refere que a higiene oral é realizada com uma escova de dentes de dureza média. Após a análise da situação, foi-lhe recomendada a mudança de escova para uma suave (Paradontax[®] ExtraSoft), desenvolvida para ajudar a prevenir o sangramento gengival, e a combinação com uma pasta de dentes indicada também para o sangramento gengival (Paradontax[®]). O utente foi alertado para o sabor característico da pasta, de modo a não estranhar na primeira utilização, e acabou por optar pela pasta extra fresca.

PARTE B

**RELATÓRIO ESTÁGIO CURRICULAR INDÚSTRIA FARMACÊUTICA
– PHARMILAB**

LISTA DE ABREVIATURAS

CE – Conselho Europeu

CEE – Comunidade Económica Europeia

CIR – *Cosmetic Ingredient Review*

CosIng – *Cosmetic Ingredient Database*

CPNP – Portal de Notificação de Produtos Cosméticos

DIV – Dispositivo médico de Diagnóstico *in vitro*

DM – Dispositivo Médico

ECHA – *European Chemical Agency*

EMA – *European Medicines Agency*

EU – *European Union*

HMPC – *Committee on Herbal Medicinal Products*

ISO – *International Organization for Standardization*

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

NICNAS – *National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme*

NP – Norma Portuguesa

PIF – *Product Information File* / Ficheiro de Informação do Produto

RAS – Relatório de Avaliação de Segurança

SCCS – *Scientific Committee on Consumer Safety*

SGQ – Sistema de Gestão da Qualidade

SWOT – *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*

TOXNET – *Toxicology Data Network*

UE – União Europeia

INTRODUÇÃO

Durante os cinco anos de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, a formação recebida na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, permite-nos desenvolver capacidades necessárias para desempenhar a profissão farmacêutica de forma única e imprescindível, como profissionais técnica e cientificamente competentes.

Atualmente o setor farmacêutico encontra-se em surpreendente evolução e expansão, nomeadamente na área da indústria farmacêutica, e, uma vez que o estágio curricular constitui a primeira oportunidade de contacto com a realidade do exercício da profissão, para além do estágio curricular em Farmácia Comunitária optei também por realizar um estágio curricular em Indústria Farmacêutica, nomeadamente na Área Regulamentar e da Qualidade, com a principal finalidade de contactar com outras vertentes da nossa profissão enquanto Farmacêuticos e, assim, adquirir novas competências.

Enquanto profissional de saúde, o Farmacêutico encontra-se altamente qualificado para atuar em todas as áreas que abrangem o conceito do medicamento, como referido no ato farmacêutico. O ato farmacêutico encontra-se legislado no Decreto-Lei nº 288/2001, e integra as diversas atividades inerentes à profissão farmacêutica, entre as quais: “b) registo, fabrico e controlo dos medicamentos de uso humano e veterinário e dos dispositivos médicos”; “h) informação e consulta sobre medicamentos de uso humano e veterinário e sobre dispositivos médicos, sujeitos e não sujeitos a prescrição médica, junto de profissionais de saúde e de doentes, de modo a promover a sua correta utilização”; “i) acompanhamento, vigilância e controlo da distribuição, dispensa e utilização de medicamentos de uso humano e veterinário e dispositivos médicos”.⁽¹⁾

Estagiar na Pharmilab, uma empresa em desenvolvimento e expansão, permitiu-me o contacto com uma área diferente, tendo sido, por isso, uma experiência imensamente enriquecedora, que me permitiu não só consolidar conhecimentos previamente adquiridos, como também adquirir outros conhecimentos e competências novas. Foi com grandes expectativas que escolhi a Pharmilab, em Coimbra, para realizar o meu estágio curricular, que decorreu entre o dia 15 de maio e o dia 11 de agosto de 2017, sob orientação da Dra. Liliana Teles.

Com este relatório pretendo descrever esta experiência, sumariando as atividades desenvolvidas, os conhecimentos e aptidões adquiridas ao longo do estágio através de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*).

ANÁLISE SWOT

De modo a descrever melhor o meu estágio curricular na Pharmilab e realizar uma avaliação crítica do mesmo, realizei uma análise SWOT (*Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*) com o intuito de sistematizar e relacionar os pontos fortes e fracos, bem como as oportunidades e ameaças inerentes ao estágio curricular.

Tabela I – Análise SWOT do estágio na Pharmilab.

	Positivos	Negativos
Análise interna	<p><u>Pontos Fortes</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ✗ Boa receção e trabalho em equipa ✗ Outra vertente das Ciências Farmacêuticas ✗ Estágio variado ✗ Possibilidade de aplicar na prática os conhecimentos adquiridos ao longo do MICF ✗ Acesso a informação e documentação científica e regulamentar ✗ Autonomia / Espírito crítico ✗ Contacto com Língua Inglesa ✗ Ferramentas informáticas 	<p><u>Pontos Fracos</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ✗ Dificuldade durante a pesquisa de informação científica adequada ✗ Notificação de Produtos Cosméticos
Análise externa	<p><u>Oportunidades</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ✗ Novo Regulamento relativo a Dispositivos Médicos ✗ Fundamentação de alegações 	<p><u>Ameaças</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ✗ Poucos conhecimentos adquiridos nesta área durante o MICF

PONTOS FORTES

1. Boa recepção e trabalho em equipa

Como estagiária, torna-se essencial a qualidade da equipa de trabalho na qual somos inseridos, já que é esta que nos transmite os conhecimentos e nos orienta na execução das tarefas. Diariamente trabalhei com uma equipa de excelentes profissionais que me incutiu o espírito de cooperação, aprendizagem e atualização contínua de conhecimentos, e que sempre se mostrou disponível para me ajudar e esclarecer todas as minhas dúvidas.

2. Outra vertente das Ciências Farmacêuticas

A Pharmilab consiste numa empresa de Consultoria Regulamentar e Controlo de Qualidade para o setor de Dispositivos Médicos, Cosméticos, Biocidas, Suplementos Alimentares e Químicos. Este estágio permitiu-me conhecer e contactar com outras áreas das Ciências Farmacêuticas integradas na Indústria Farmacêutica, como a Qualidade e a Área Regulamentar de Cosméticos e de Dispositivos Médicos (DM's).

Ao longo deste estágio fui-me apercebendo da importância do Farmacêutico, não só como agente da saúde pública zelando sempre para o bem-estar da comunidade e do ambiente, mas também como um profissional com um amplo conhecimento aliado a um espírito crítico e de análise sempre presentes.

A realização do estágio curricular na Pharmilab foi sem dúvida um grande ponto forte do meu estágio curricular, uma vez que me proporcionou uma perspetiva diferente do papel do Farmacêutico, noutra área que não diretamente relacionada com o medicamento.

3. Estágio variado

O meu estágio foi dividido essencialmente em duas partes. Inicialmente fui integrada na área da Qualidade, particularmente num projeto de realização e aprimoramento de dois Sistemas de Gestão da Qualidade (SGQ's) segundo as normas ISO NP 9001:2015 “Sistemas de Gestão da Qualidade – Requisitos”, ISO 22716:2007 “*Cosmetics – Guidelines on Good Manufacturing Practices*” e ISO 13485:2016 “*Medical devices – Quality management systems – Requirements for regulatory purposes*”, e posterior implementação em duas empresas: uma de produção de Dispositivos Médicos de Diagnóstico *in vitro* (DIV's) e outra de produção de Produtos Cosméticos e DM's. Ainda nesta fase, tive a oportunidade de adaptar um Manual de Boas Práticas de Distribuição à realidade de uma empresa de distribuição de cosméticos e outros

produtos. Posteriormente, o estágio incidiu particularmente na Área Regulamentar de Cosméticos, durante a qual realizei várias avaliações toxicológicas de ingredientes recorrendo a literatura científica disponível.

Assim, durante o estágio que aqui realizei, as tarefas que executei foram muito diversificadas, dando-me uma perspetiva mais ampla, não só do funcionamento e área de aplicação da empresa, como também do campo de atuação do Farmacêutico na Área Regulamentar e da Qualidade, e, portanto, senti que foi um grande ponto forte para o meu estágio.

4. Possibilidade de aplicar na prática os conhecimentos adquiridos

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas proporciona-nos um vasto conhecimento científico. No entanto, a nossa formação como Farmacêuticos não se limita apenas ao percurso académico, que sem dúvida que constitui uma base sólida de conhecimentos.

Apesar de ao longo do percurso académico termos a oportunidade de contactar com algumas das normas ISO acima referidas, na minha perspetiva, a abordagem na faculdade é muito teórica, sendo por vezes difícil de compreender como a norma se aplica à realidade prática. Durante o estágio tive a oportunidade de aplicar as normas ISO, permitindo-me perceber como é feita esta aplicação e adaptação das normas a uma empresa, tendo sido uma mais-valia para a minha aprendizagem.

5. Acesso a informação e documentação científica e regulamentar

Durante todo o estágio contactei com várias informação e documentação científica e regulamentar. Para além das normas ISO já referidas, contactei ainda com as normas ISO NP 19001:2003 “Linhas de orientação para auditorias a sistemas de gestão da qualidade e/ou de gestão ambiental”, ISO 14971:2007 “*Application of risk management to medical devices*”, e ISO 14729:2001 “*Microbiological requirements and test methods for products and regimens for hygienic management of contact lenses*”.

Adicionalmente à literatura científica acima mencionada, também tive acesso a várias bases de dados, nomeadamente *Cosmetic Ingredient Database (CosIng)*, *European Chemical Agency (ECHA)* e *Cosmetic Ingredient Review (CIR)*, e os documentos a elas associadas, incluindo Opiniões do *Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS)* e Relatórios de Segurança do CIR, várias Avaliações de Segurança do *Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)* da *European Medicines Agency (EMA)*. Muitas vezes durante a pesquisa de informação para a realização do perfil toxicológico de ingredientes também recorri à base de dados do *National Industrial*

Chemicals Notification and Assessment Scheme (NICNAS) e *Toxicology Data Network (TOXNET)*. Durante o estágio contactei ainda com vários regulamentos e diretivas, tais como Regulamento (CE) 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, relativo aos Produtos Cosméticos, Diretivas 93/42/CEE e 98/79/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, relativas aos Dispositivos Médicos e Dispositivos Médicos de Diagnóstico *in vitro*, respetivamente.

Todos estes documentos eram-me desconhecidos, que apesar de inicialmente a leitura dos mesmos não ter sido fácil devido à sua linguagem muito específica e característica, rapidamente me adaptei à sua interpretação, tendo sido uma mais-valia para a minha formação e para o meu estágio.

6. Autonomia/Espírito crítico

Desde o início do estágio que fui incentivada a trabalhar de forma autónoma, com um computador e um local de trabalho à minha disposição para executar as tarefas que me foram destinadas. Deste modo, considero que tenha sido fundamental para desenvolver algumas competências, tais como confiança e responsabilidade no trabalho realizado, desenvolvimento do meu espírito crítico, capacidade de superar obstáculos e adaptação às diferentes tarefas. Deste modo, foi um ponto forte o estágio ser fundamentalmente prático, tendo a equipa a oportunidade de avaliar o meu desempenho.

7. Contacto com a Língua Inglesa

Ao longo do estágio, contactei diariamente com a Língua Inglesa, língua global da tecnologia, da ciência e da comunicação internacional, quer em artigos científicos, em bases de dados, na plataforma, como em grande parte da documentação contactada. Uma vez que a grande maioria da documentação elaborada era redigida em inglês, o meu conhecimento nesta língua permitiu-me desempenhar as tarefas diárias com destreza, nomeadamente na tradução de um documento *template* de um Ficheiro de Informação do Produto (PIF) e de um Relatório de Avaliação de Segurança (RAS), e na elaboração da avaliação do perfil toxicológico de ingredientes, na qual literatura consultada também se encontrava em inglês, e a partir da qual retirava com facilidade os conceitos e informações relevantes dos documentos com posterior tratamento dos dados, tendo sido por isso um ponto forte do meu estágio.

8. Ferramentas informáticas

Durante o estágio as tarefas que desempenhei decorreram maioritariamente com recurso a ferramentas informáticas e plataformas bastante familiares, como PubMed, Word®, Excel®, e, portanto, senti uma grande facilidade em trabalhar com estas ferramentas.

A empresa possui ainda uma base de dados/plataforma, muito intuitiva e fácil de trabalhar, sendo que ao fim de poucos dias conhecia grande parte das funcionalidades. Também durante o estágio foi o meu primeiro contacto com as bases de dados já referidas, que se mostraram igualmente intuitivas e rapidamente me adaptei às suas funcionalidades. Considero, então, que as ferramentas com as quais trabalhei foram um ponto positivo durante o meu estágio curricular.

PONTOS FRACOS

1. Dificuldade durante a pesquisa de informação científica adequada

Senti, principalmente durante a fase do estágio dedicada à avaliação do perfil de segurança de ingredientes e também às fundamentações de alegações referidas adiante, alguma dificuldade durante a pesquisa de informação científica adequada, quer por falta de literatura, falta de testes realizados para os ingredientes, principalmente para extratos de plantas, como também a informação se encontrava muito dispersa. Muitas vezes os relatórios do CIR agrupavam vários ingredientes num relatório de segurança, nos quais nem sempre havia informação específica para o ingrediente em causa, dificultando a realização da tarefa. Para além de necessitar de mais tempo para estes ingredientes, após uma pesquisa exaustiva, muitas vezes a informação ainda tinha que ser extrapolada.

Apesar de ter sido um obstáculo à realização de algumas tarefas, senti que desenvolveu o meu espírito crítico, no sentido em que muitas vezes preferia mencionar que não existe informação sobre aquele ingrediente relativa a um determinado parâmetro, do que colocar uma informação extrapolada e que pudesse colocar em risco a saúde dos consumidores do produto final, cujo ingrediente se encontrasse na sua constituição.

2. Notificação de Produtos Cosméticos

Segundo o Regulamento (CE) 1223/2009, um Produto Cosmético é definido como “qualquer substância ou mistura destinada a ser posta em contacto com as partes externas do corpo humano (epiderme, sistemas piloso e capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos) ou com os dentes e as mucosas bucais, tendo em vista, exclusiva ou principalmente, limpá-los, perfumá-

los, modificar-lhes o aspeto, protegê-los, mantê-los em bom estado ou corrigir os odores corporais.”. ⁽²⁾ A pessoa responsável deve notificar os seus produtos cosméticos no Portal de Notificação de Produtos Cosméticos (CPNP) antes da respetiva colocação no mercado. ⁽³⁾ O CPNP é um portal centralizado a nível europeu, que substitui o registo nacional por cada estado-membro, e que permite o acesso das Autoridades Competentes e dos Centros Antivenenos de cada estado-membro a informações disponibilizadas para efeitos de fiscalização de mercado, análise de mercado, avaliação e informação dos consumidores e para efeitos de tratamento médico, respetivamente. ⁽⁴⁾

Considero que tenha sido um ponto fraco no meu estágio curricular na Pharmilab não ter tido a oportunidade nem de observar, nem de aprender como é feita esta notificação.

OPORTUNIDADES

1. Novo Regulamento relativo a Dispositivos Médicos

Pouco tempo após o início do meu estágio curricular na Pharmilab, foi publicado no Jornal Oficial da União Europeia o novo Quadro Regulamentar Europeu aplicável ao setor dos Dispositivos Médicos, nomeadamente os Regulamentos (EU) 2017/745 e 2017/746 do Parlamento Europeu e do Conselho, relativo a Dispositivos Médicos, e a Dispositivos Médicos para Diagnóstico *in vitro*. Como ainda me encontrava na fase do estágio de elaboração de SGQ, nomeadamente para uma empresa de produção de DIV's, tive a oportunidade de contactar com ambos os novos regulamentos, com a finalidade de perceber se haveria alguma alteração imediata que afetasse o SGQ que me encontrava a elaborar.

Deste modo, considero que tenha sido uma grande oportunidade, uma vez tive contacto com os regulamentos pouco tempo após a sua publicação, tendo aumentado os meus conhecimentos e perspetivas em relação à Área Regulamentar relativa a DM's e DIV's.

2. Fundamentação de Alegações

Quando já me encontrava na fase do estágio focada na área regulamentar de produtos Cosméticos, deram-me a oportunidade de elaborar duas fundamentações de alegações. De acordo com o Regulamento (UE) 655/2013 da Comissão, que estabelece critérios comuns para justificação das alegações relativas a produtos cosméticos, “As alegações relativas a produtos cosméticos têm como principal objetivo informar os utilizadores finais sobre as características e as qualidades dos produtos. Essas alegações são formas essenciais para diferenciar produtos.

Contribuem igualmente para estimular a inovação e fomentar a concorrência.”. De modo a “garantir um elevado nível de proteção do consumidor final, em especial no que diz respeito às alegações enganosas relativas a produtos cosméticos”, devem ser realizadas sustentações de prova. Ou seja, “as alegações relativas a produtos cosméticos, explícitas ou implícitas, devem ser baseadas em elementos comprovativos adequados e verificáveis”.⁽⁵⁾

Assim, considero que tenha sido uma oportunidade no meu estágio, não só porque tive acesso a mais documentos, como “Relatório da Comissão ao Parlamento Europeu e ao Conselho sobre alegações relativas aos produtos baseados em critérios comuns no domínio dos cosméticos”, o Regulamento já referido, e também às “*Guidelines to Commission Regulation (EU) No 655/2013 laying down common criteria for the justification of claims used in relation to cosmetic products*”, como também consistiu noutra tarefa nova e desconhecida nesta área.

AMEAÇAS

I. Poucos conhecimentos adquiridos nesta área durante o MICF

Apesar da vasta gama de conhecimentos adquiridos durante a formação académica, durante o estágio senti uma lacuna na minha formação, especialmente na área regulamentar de Produtos Cosméticos e DM's.

Ao longo do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas a abordagem das cadeiras relacionadas com Produtos Cosméticos e DM's não nos possibilitam o contacto com a área regulamentar destes produtos, resultando numa falta de conhecimentos que considero que eram essenciais para que o meu desempenho durante o estágio.

CONCLUSÃO

O estágio curricular representa o nosso primeiro contacto com a realidade profissional, e por isso, a oportunidade de estagiar numa área distinta da Farmácia Comunitária, na qual o Farmacêutico desempenha também um papel fundamental, apresenta-se como uma mais-valia para a nossa formação como futuros Farmacêuticos.

Apesar de o Farmacêutico ser um profissional de saúde capaz de se adaptar a qualquer situação, atualmente, olhando para o mundo profissional cada vez mais desafiante e competitivo, torna-se crucial a nossa distinção, tanto a nível profissional como a nível formativo.

Como futura Farmacêutica, o meu estágio curricular na Pharmilab revelou-se um uma grande oportunidade para a minha formação, não só pela aquisição e desenvolvimento de novas

competências, como também me proporcionou uma perspectiva diferente acerca de empresas de consultoria no setor de Dispositivos Médicos e Produtos Cosméticos.

Deste modo, a minha formação académica termina com uma visão alargada da atividade do Farmacêutico na área da indústria farmacêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Decreto-Lei n° 288/2001 de 10 de novembro.** Diário da República – I Série A.
2. **Regulamento (CE) n° 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de novembro de 2009 relativo aos produtos cosméticos.** Jornal Oficial da União Europeia.
3. **Cosméticos – Colocação no mercado e registo.** INFARMED.
4. **Quem são os utilizadores do Portal de Notificação de Produtos Cosméticos (CPNP)?.** INFARMED. [Acedido a 18 de agosto de 2017]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/perguntas-frequentes-area-transversal/cosmeticos>
5. **Regulamento (UE) n° 655/2013 da Comissão de 10 de julho de 2013 que estabelece critérios comuns para justificação das alegações relativas a produtos cosméticos.** Jornal Oficial da União Europeia.

PARTE C

MICRORNAS E HDLS: ALVOS PROMISSORES NA TERAPÊUTICA DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABCA1 – *ATP-Binding Cassette Transporter A1*
- ABCG1 – *ATP-Binding Cassette Transporter G1*
- apoA-I – Apolipoproteína A-I
- CE – Colesterol Esterificado
- CEPT – Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol (*Cholesterol Ester Transfer Protein*)
- CV – Cardiovascular
- DCV – Doenças Cardiovasculares
- eNOS – Sintetase Endotelial do Óxido Nítrico (*Endothelial Nitric Oxide Synthase*)
- HDL – Lipoproteínas de Alta Densidade (*High-Density Lipoproteins*)
- HDL-C – Colesterol HDL
- ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular (*Intercellular Adhesion Molecule 1*)
- LCAT – Lecitina Colesterol Aciltransferase (*Lecithin Colesteryl Acyltransferase*)
- LDL – Lipoproteínas de Baixa Densidade (*Low-Density Lipoproteins*)
- LDLr – Recetor de LDL
- M-CSF – Fator Estimulante de Colónias de Macrófagos (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*)
- miRNA – micro Ácido Ribonucleico (*micro Ribonucleic Acid*)
- mRNA – RNA mensageiro
- nHDL – HDL nascente
- NO – Óxido Nítrico (*Nitric Oxide*)
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- PAF-AH – Fator ativador de plaquetas (*Platelet-activating factor-acetyl hydrolase*)
- PONI – Paraoxonase I
- RCT – Transporte reverso de colesterol (*Reverse Cholesterol Transport*)
- RISC – *RNA-inducing silencing complex*
- ROS – Espécies Reativas de Oxigénio (*Reactive Oxygen Species*)
- SAA – Amiloide A sérica (*Serum Amyloid A*)

SMC – Células Musculares Lisas (*Smooth Muscular Cells*)

SR-BI – *Scavenger receptor B I*

SREBP – *Sterol regulatory element-binding proteins*

sRNA – *small RNA*

TG – Triglicerídeos

VCAM-I – Molécula de adesão celular vascular I (*Vascular Cell Adhesion Molecule I*)

VLDL – Lipoproteínas de muito baixa densidade (*Very-Low Density Lipoproteins*)

I. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) consistem num conjunto de doenças que englobam a doença arterial coronária, insuficiência cardíaca, enfarte do miocárdio e acidente vascular cerebral (AVC). ^(1, 2) Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) as DCV constituem a principal causa de mortalidade e morbidade nos países desenvolvidos, estimando-se que 17,7 milhões de pessoas morreram em 2015 como consequência de DCV, representando 31% da mortalidade global. ⁽¹⁾ A grande maioria das DCV é provocada pela aterosclerose. ^(2, 3)

A aterosclerose é uma doença inflamatória crónica da parede arterial. ^(3, 4) É caracterizada pela acumulação subendotelial de colesterol associado a lipoproteínas de baixa densidade (LDL), e à consequente formação de ateromas, ^(4, 5) que são placas, compostas essencialmente por tecido fibroso e lípidos, que se vão acumulando no endotélio, conduzindo gradualmente a uma perda da elasticidade da parede e a uma diminuição do lúmen ou até mesmo a obstrução total do vaso. ⁽⁵⁾

A patogénese da formação da placa aterosclerótica consiste num processo multifatorial, no qual as lipoproteínas de alta densidade (HDL) desempenham um papel fundamental, principalmente na regressão e na prevenção da formação da placa aterosclerótica, principalmente através da sua atividade no transporte reverso de colesterol, ou seja, na remoção do excesso de colesterol dos tecidos periféricos, incluindo das células do espaço subendotelial, e o seu transporte para os hepatócitos. Deste modo, as HDL têm sido sugeridas como alvos terapêuticos promissores devido à diversidade das suas ações benéficas no contexto da aterosclerose.

Os miRNAs são *small RNAs* não codificantes, com aproximadamente 22 nucleótidos de comprimento, que atuam na regulação de genes a nível pós-transcricional. Tem-se verificado que os teores circulantes de miRNAs se encontram alterados em vários estados patológicos, incluindo na aterosclerose. Uma vez que estes miRNAs controlam redes de genes envolvidas num processo biológico, são potenciais alvos terapêuticos, nomeadamente na aterosclerose.

A presente monografia tem como principal objetivo a abordagem das HDL e dos miRNAs como alvos terapêuticos promissores da aterosclerose, com o foco nas principais funções das HDL e dos miRNAs envolvidos na prevenção e na regressão da placa aterosclerótica.

2. ATEROSCLEROSE: FISIOPATOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO DA PLACA ATEROSCLERÓTICA

A aterosclerose representa uma doença da parede das grandes e médias artérias, cuja patologia subjacente é caracterizada por um processo inflamatório crónico, que se manifesta em determinados pontos da vasculatura, particularmente em locais onde ocorre perturbação do fluxo sanguíneo. ^(2, 6, 7)

As artérias normais apresentam uma estrutura trilaminar bem desenvolvida: ^(2, 8)

1. A túnica íntima, a camada mais interna, é constituída por um revestimento endotelial, o subendotélio e uma camada externa, a lâmina elástica interna, que a separa da túnica média;
2. A túnica média, a camada intermediária, constituída essencialmente por células musculares lisas (SMC) e fibras elásticas;
3. A túnica externa ou adventícia, a camada mais externa, composta fundamentalmente por tecido conjuntivo e uma lâmina elástica externa. ⁽⁹⁾

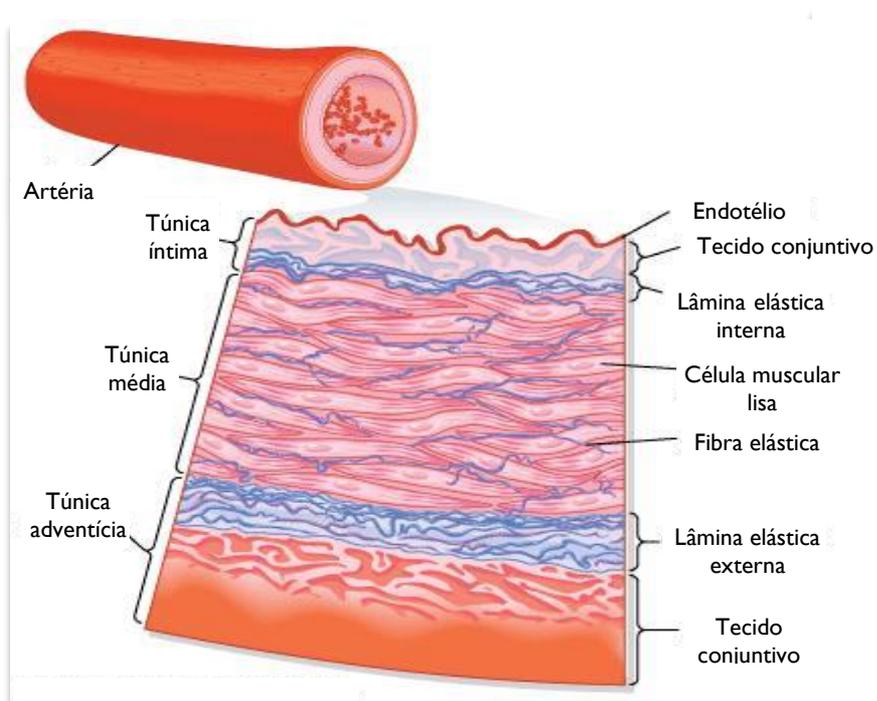


Figura 1 – Secção transversal de uma artéria. Adaptado de Encyclopaedia Britannica, Inc. (2008).

A aterogénese consiste na interação complexa de fatores de risco com células sanguíneas e da parede arterial, na qual a inflamação desempenha um papel importante em todas as etapas do processo. ⁽⁸⁾

A formação da placa aterosclerótica na camada interna ocorre fundamentalmente em três etapas progressivas: ^(2, 7)

1. Formação de estrias gordas resultantes da acumulação de células esponjosas na camada íntima, formadas a partir de macrófagos ou SMC, que evoluem gradualmente em lesões, denominadas placas gordas;
2. Formação da placa fibrosa, caracterizada pela proliferação de SMC para a zona da íntima e pela formação da capa fibrosa rica em colagénio que envolve um núcleo lipídico de células esponjosas, e ainda pela acumulação extracelular de colesterol esterificado (CE);
3. Ocorrência da lesão avançada, que pode manifestar calcificação, hemorragia, rutura e trombose; é a lesão avançada que frequentemente está subjacente ao evento clínico agudo de oclusão arterial e que conduz a enfarte do miocárdio ou AVC. ^(7, 8)

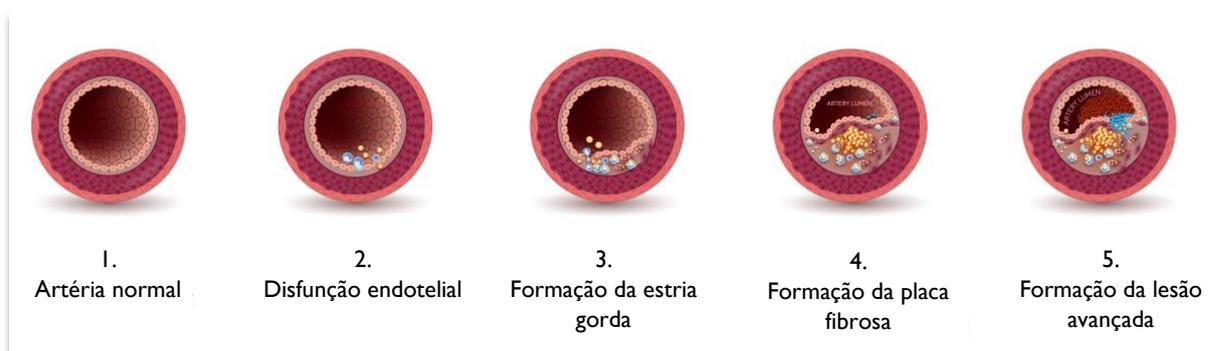


Figura 2 – Comparação de uma artéria normal com as diferentes fases da formação da placa aterosclerótica. Retirado e adaptado de <http://www.istockphoto.com/pt/vetorial/atherosclerosis-formation-gm650222892-118194823>

O evento primário iniciador da aterosclerose consiste na acumulação de LDL na matriz subendotelial. Esta acumulação é tanto maior quanto maiores os níveis de LDL em circulação, uma vez que tanto o transporte como a entrada de LDL para a íntima se encontram significativamente aumentados nestas condições, em particular nos locais mais propensos à formação da lesão. ^(6, 10)

Estes locais consistem em áreas de ramificações, bifurcações e curvaturas, já que nestas regiões ocorre uma perturbação do fluxo sanguíneo, caracterizada pela diminuição do *shear stress* e/ou pelo aumento na turbulência deste fluxo. Como consequência, ocorre a regulação positiva, pelo endotélio, da expressão de moléculas de adesão envolvidas no recrutamento de monócitos e de células T, e ainda um aumento da permeabilidade do endotélio. ^(7, 10)

Nestes locais, as LDL difundem passivamente através das junções das células endoteliais, e, uma vez aprisionadas, sofrem modificações incluindo oxidação, lipólise, proteólise e agregação. Tais modificações contribuem para o estabelecimento de um processo inflamatório, bem como para

a formação de células esponjosas. A oxidação lipídica, como resultado da exposição das LDL a produtos do metabolismo das células vasculares, nomeadamente a espécies reativas de oxigénio (ROS), constitui uma das modificações com maior significado para a formação precoce de lesões ateroscleróticas. ^(7, 10)

A acumulação de LDL oxidadas na íntima estimula as células endoteliais a produzir moléculas pró-inflamatórias, como moléculas de adesão e fatores de crescimento, incluindo o fator estimulante de colónias de macrófagos (M-CSF), promovendo também o recrutamento de monócitos e linfócitos T para o local, e a diferenciação de monócitos em macrófagos. As LDL oxidadas podem também inibir a produção de óxido nítrico (NO) pelo endotélio, um mediador químico com múltiplas propriedades anti-aterogénicas, como o seu efeito vasorrelaxante. ⁽¹⁰⁾

As estrias gordas, as primeiras lesões visíveis na parede arterial, são formadas posteriormente à disfunção endotelial, na sequência da adesão de monócitos circulantes às células endoteliais (Figura 3). Estes monócitos migram, subsequentemente, em direção ao espaço subendotelial em resposta a fatores quimiotáticos produzidos localmente, onde se diferenciam em macrófagos. Os macrófagos captam as LDL oxidadas, que são degradadas por endocitose. Estes macrófagos, quando carregados de lípidos no seu citoplasma, formam, então, as células esponjosas. ^(7, 8, 10)

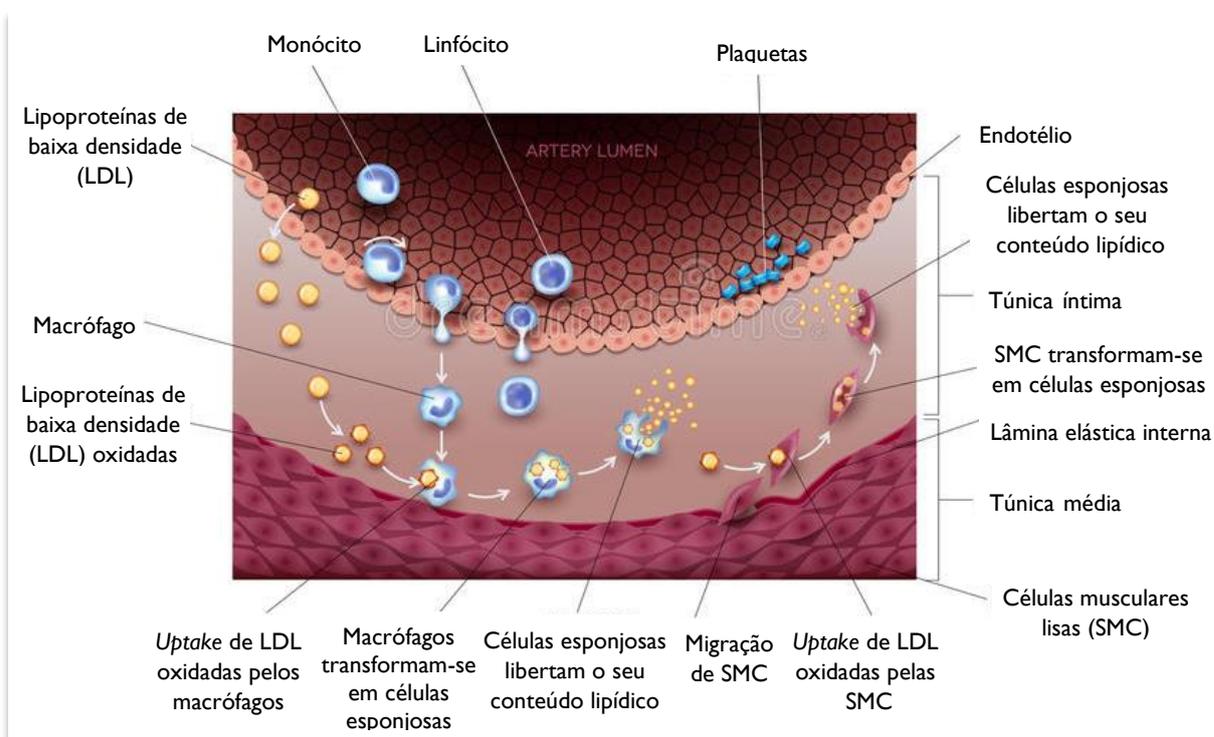


Figura 3 – Formação das células esponjosas na túnica íntima da artéria. Retirado e adaptado de <http://www.istockphoto.com/pt/vetorial/fatty-streak-formation-in-the-artery-gm650222948-118194843>

Estas células esponjosas, juntamente com os linfócitos T também recrutados da circulação, produzem e libertam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, juntamente com outras moléculas

reguladoras. Esta diversidade de mediadores inflamatórios promove a inflamação localizada da parede arterial, contribuindo para a progressão das lesões ateroscleróticas. Como consequência do processo inflamatório do ateroma inicial, as SMC migram da região média para a túnica íntima como resposta aos fatores secretados pelos monócitos e macrófagos, onde acumulam colesterol, dando também origem a células esponjosas derivadas de SMC. Estas células proliferam e produzem uma matriz extracelular complexa, resultando na formação da capa fibrosa da lesão, composta por colagénio e SMC (Figura 4).^(6, 7, 8 10)

Além da proliferação celular, ocorre frequentemente morte celular nestas lesões. A morte das células esponjosas conduz à formação de um núcleo típico da placa aterosclerótica – um núcleo necrótico rico em lípidos libertados para o espaço extracelular, envolto pela capa fibrosa (Figura 4).^(7, 8, 10)

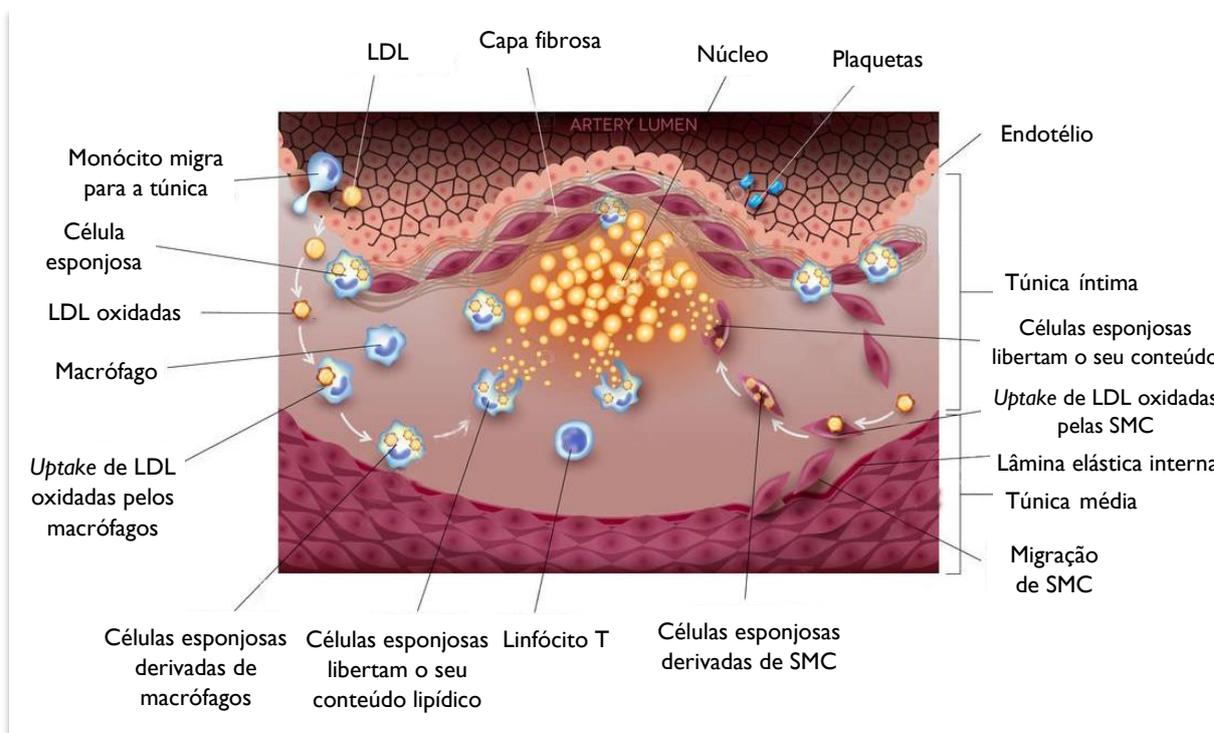


Figura 4 – Formação da placa fibrosa. Retirado e adaptado de <http://www.istockphoto.com/pt/vetorial/stable-plaque-formation-in-the-human-artery-gm650222918-118194833>

Como consequência do aumento da lesão e da progressão da sua complexidade, ocorre o estreitamento do vaso. O desenvolvimento de trombos capazes de obstruir o fluxo sanguíneo depende principalmente da composição e da vulnerabilidade da placa. As placas vulneráveis apresentam geralmente um núcleo necrótico de grandes dimensões, uma capa fibrosa fina e um número aumentado de células inflamatórias (Figura 5) nas regiões onde mais comumente ocorre a rutura: as regiões em arco.^(6, 7, 10)

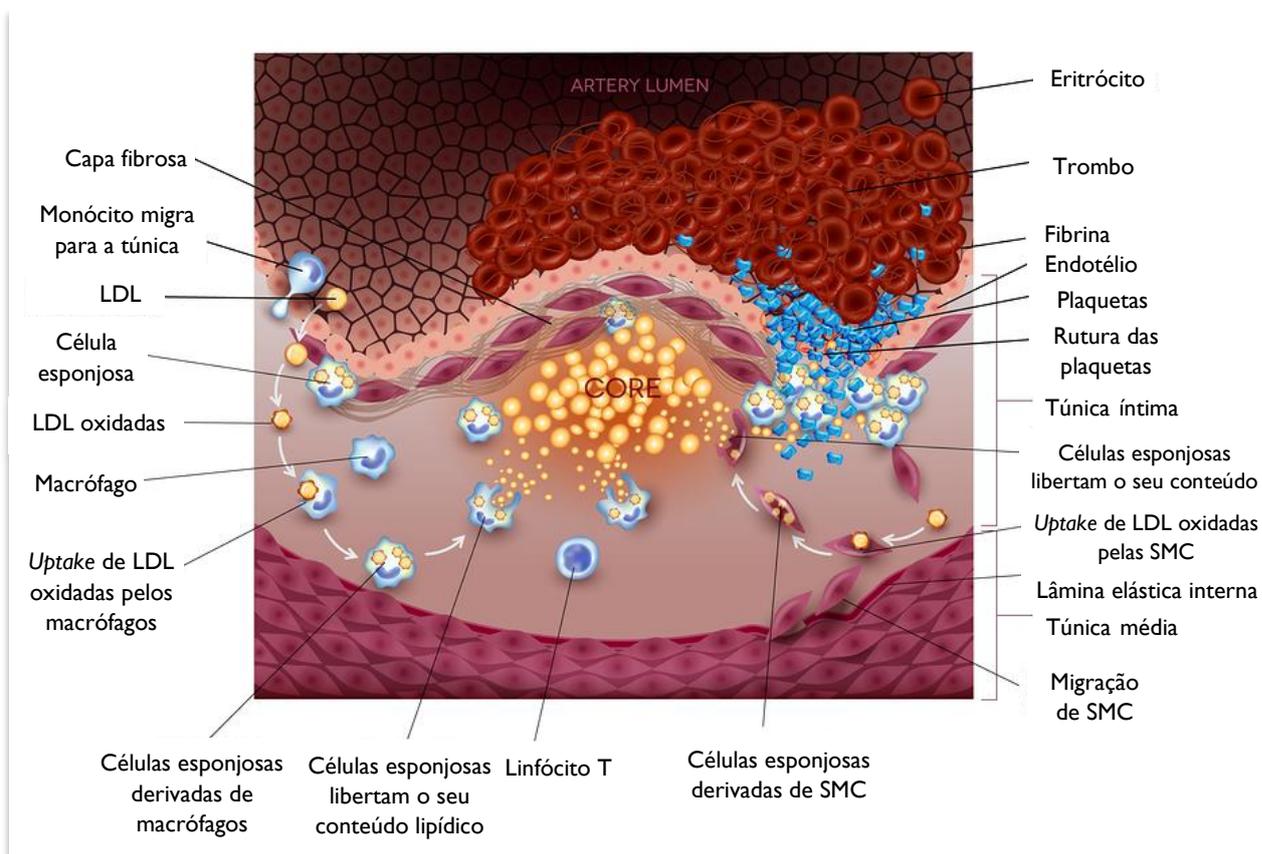


Figura 5 – Lesão avançada de uma placa vulnerável. Retirado e adaptado de <http://www.istockphoto.com/pt/vetorial/thrombus-blood-clot-unstable-plaque-gm650222864-118194809>

3. AS HDL E O PAPEL NA PREVENÇÃO DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

A composição das HDL

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) consistem num grupo heterogêneo de partículas discoides e esféricas. As HDL são as lipoproteínas de menores dimensões (7-12 nm de diâmetro) e as mais densas (1,063-1,25 g/ml), com o maior teor em proteína (30-70%) em comparação com outras frações lipoproteicas. ⁽¹¹⁻¹⁴⁾

A estrutura das HDL consiste numa estrutura globular, cujo núcleo lipídico hidrofóbico é constituído principalmente por colesterol esterificado e uma pequena quantidade de triglicerídeos (TG) e colesterol livre, envolvido por uma camada externa de fosfolípidos, colesterol livre e apolipoproteínas. ^(8, 12, 13) A principal apolipoproteína estrutural das HDL, apolipoproteína A-I (apoA-I), desempenha um papel chave na biogénese, no metabolismo intravascular e na função destas lipoproteínas. ^(11-13, 15-17)

As partículas HDL plasmáticas também servem como transportadores plasmáticos de várias enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, incluindo a lecitina colesterol aciltransferase

(LCAT), a proteína transferidora de ésteres de colesterol (CEPT), enzimas com atividades antioxidantes tais como a paraoxonase I (PONI) e um fator de ativação plaquetária *platelet-activating factor-acetyl hydrolase* (PAF-AH), também conhecido como fosfolipase A2 associada a lipoproteínas. Além disto, transportam outras proteínas, incluindo múltiplas cópias de vários miRNAs que podem ser entregues às células e tecidos onde exercem o seu potencial papel na regulação génica e na comunicação intercelular, e ainda a amiloide A sérica (SAA) que desempenha um papel importante na fase aguda da inflamação. ⁽¹⁰⁻¹²⁾

As HDL e o transporte reverso de colesterol

As HDL são importantes na prevenção das DCV, nomeadamente na prevenção da aterosclerose, devido à sua ação protetora contra a formação de placas ateroscleróticas em particular através da remoção do excesso de colesterol dos macrófagos da íntima das artérias, ou seja, promovem o transporte reverso de colesterol (RCT). ^(8, 10-13, 15-18)

A biossíntese de HDL tem início no fígado e intestino com a síntese de apoA-I pobre em lípidos de forma discoide, seguida rapidamente da aquisição de colesterol livre e fosfolípidos da membrana celular não só dos hepatócitos como também de diferentes células de outros tecidos através do efluxo de colesterol destas células, mediado por transporte ativo via *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1), levando à formação de HDL nascente (nHDL ou pré β -HDL) (Figura 6). Na parede arterial, o transportador ABCA1 juntamente com um segundo transportador ABC, ABCG1, facilitam a lipidação adicional das nHDL, tornando-as em partículas HDL maiores e enriquecidas em colesterol. ^(8, 11, 13-17)

Posteriormente, a LCAT presente no plasma catalisa a esterificação do colesterol livre disposto na monocamada destas partículas, formando colesterol esterificado, que é hidrofóbico e migra para o interior das partículas, constituindo o núcleo das HDL. Esta esterificação do colesterol converte as HDL discoides em partículas progressivamente menos densas, maiores, e mais esféricas, ou seja, em HDL maduras. ^(8, 11, 14-16)

Um destino destas partículas HDL maduras é serem seletivamente captadas pelo fígado através do *scavenger receptor B1* (SR-B1) hepático (Figura 6), onde o colesterol esterificado é excretado após hidrólise, como colesterol livre na bÍlis, ou como conjugado após a conversão em ácidos biliares. Alternativamente, o colesterol esterificado das HDL pode ser transferido para lipoproteínas contendo apoB, ou seja, as LDL e as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), através da glicoproteína CEPT, em troca de triglicerídeos. As VLDL e LDL são posteriormente captadas pelo fígado através do recetor de LDL (LDLr). A ação da CEPT

promove a redução do tamanho das HDL e a formação de HDLs pobres em lípidos, que podem interagir com os transportadores ABC no ciclo seguinte e remover mais colesterol das células dos tecidos periféricos, mantendo o ciclo do RCT. ^(8, 13-16, 18)

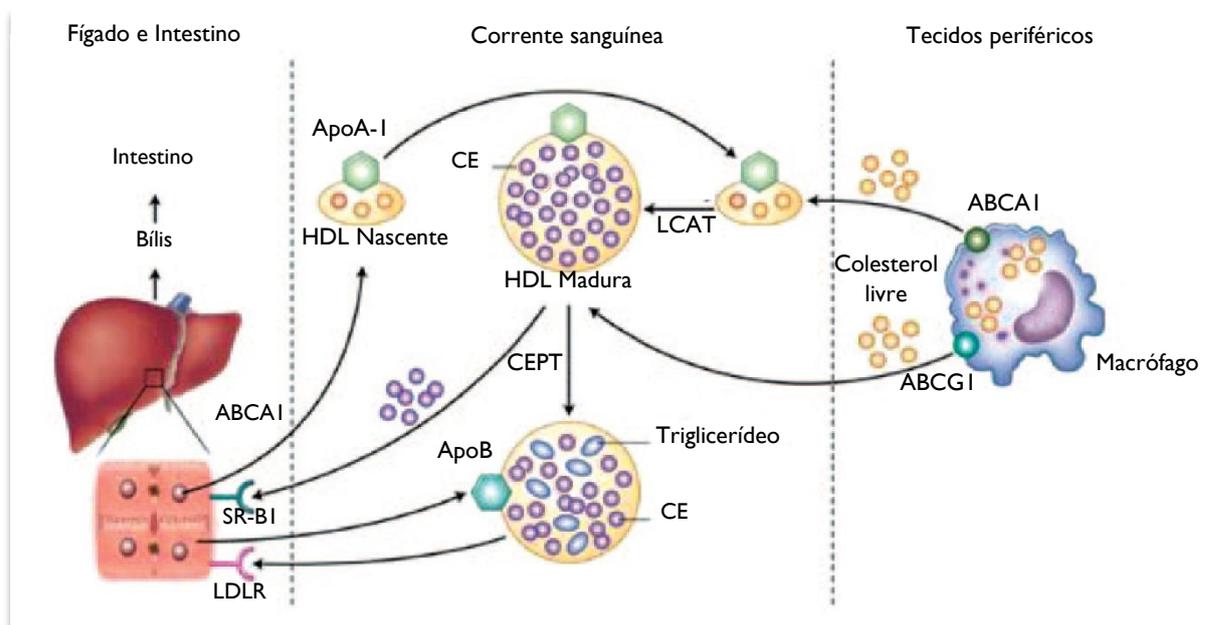


Figura 6 – Metabolismo do HDL-C e transporte reverso de colesterol. A apoA-I é sintetizada tanto pelo fígado como pelo intestino e é secretada na sua forma livre de lípidos. A lipidação da partícula ocorre a partir da aquisição de fosfolípidos e de colesterol livre via ABCA1 para formar HDL nascente. Estas HDL nascentes podem captar mais quantidade de colesterol livre via ABCA1 presente nos tecidos periféricos. As HDL maduras são formadas a partir das ações da LCAT, que catalisa a esterificação do colesterol livre. As HDL maduras interagem com o ABCG1 nos macrófagos, promovendo o efluxo de colesterol e a sua posterior entrega ao fígado, via SR-BI. Alternativamente, a CEPT pode facilitar o transporte de colesterol esterificado das HDL para lipoproteínas contendo apoB, tais como as VLDL e as LDL, que são subsequentemente captadas pelo fígado. Adaptado. ⁽¹⁶⁾

Outras propriedades ateroprotetoras das HDL

Além da promoção do efluxo celular de colesterol e da consequente manutenção da homeostase do colesterol extracelular, vários estudos recentes descobriram outras funções das HDL que contribuem também para a sua capacidade de reduzirem o risco cardiovascular (CV) (Tabela 1). De referir a sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitrombótica, vasodilatadora, e ainda a capacidade de promover a reparação endotelial e a angiogénese, o aumento da função endotelial, a inibição da proliferação de células hematopoiéticas e a inibição da apoptose celular. ^(10, 11, 16-18)

As propriedades antioxidantes das proteínas major das HDL, apoA-I, bem como LCAT, PON1 e PAF-AH são largamente reconhecidas, e como consequência, as HDL são capazes de inibir a modificação oxidativa das LDL, reduzindo deste modo as propriedades aterogénicas destas últimas lipoproteínas. A atividade anti-inflamatória das HDL deve-se também à inibição da

expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, reduzindo assim o recrutamento de monócitos da circulação para a parede arterial. ^(15, 17)

Tabela I - Principais atividades ateroprotetoras das HDL

- Transporte reverso colesterol
- Atividade antioxidante
- Efeito anti-inflamatório
- Ação antitrombótica
- Efeito vasodilatador
- Restauração da função endotelial
- Promoção da angiogénese
- Aumento da reparação endotelial
- Inibição da proliferação de células hematopoiéticas
- Inibição da apoptose

O efluxo de colesterol das células mediado pelos ABCA1 e ABCG1 mostrou também regular a proliferação de células hematopoiéticas e suprimir a produção de neutrófilos e monócitos. Além disto, este efluxo está ainda associado à supressão da produção de células inflamatórias, citocinas e quimiocinas nas lesões ateroscleróticas (Figura 7). Nos macrófagos, este processo de remoção de colesterol intracelular diminui a formação de células esponjosas e a ativação de macrófagos, e, conseqüentemente, a expressão de citocinas que promove a produção de monócitos e neutrófilos na medula óssea e estimulam a infiltração de monócitos nas placas ateroscleróticas. ^(15, 17)

As HDL podem também aumentar a reparação e a função endotelial através da promoção da síntese endotelial de óxido nítrico, um potente vasodilatador. Além disto, as HDL podem ainda exercer uma ação antiapoptótica sobre o endotélio, envolvendo a ativação da *phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt* e a regulação positiva da proteína reguladora da apoptose celular, a *Bcl-2-like protein 1*, também conhecida como reguladora da apoptose Bcl-X. ⁽¹⁷⁾

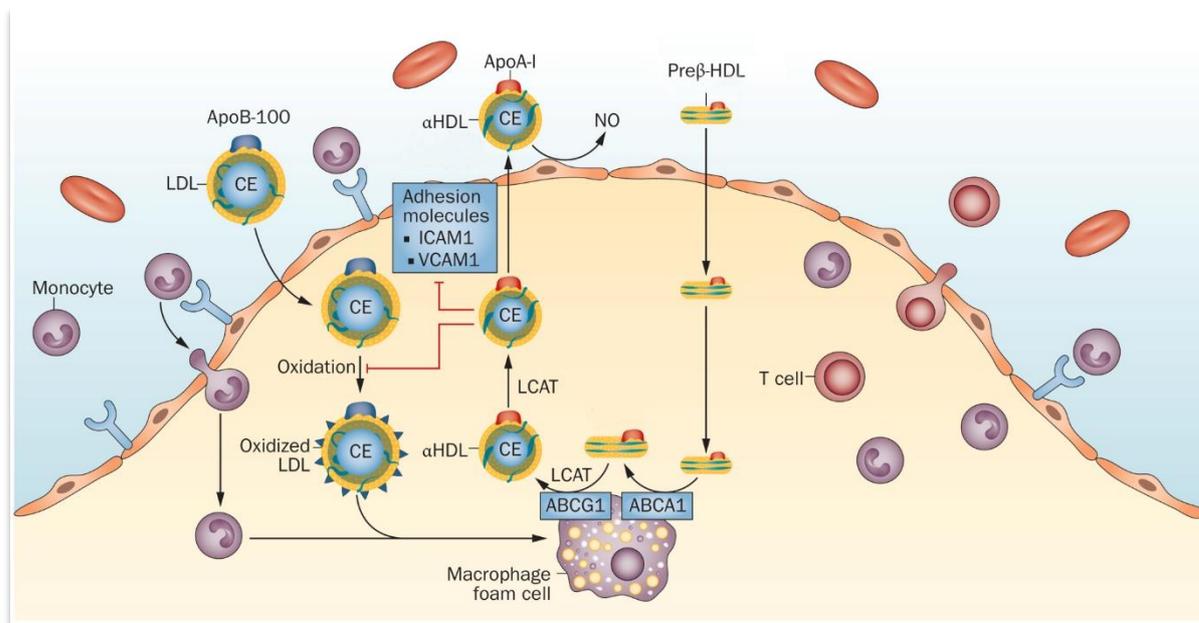


Figura 7 – Potenciais atividades ateroprotetoras das HDL. As préβ-HDL ligam-se ao ABCA1 e iniciam o efluxo de colesterol com a conversão de préβ-HDL em αHDL. A LCAT catalisa a esterificação do colesterol em CE e a maturação das HDL em HDL maduras ricas em CE, que transportam o colesterol até ao fígado, ou trocam o seu conteúdo em CE por TG das lipoproteínas contendo apoB (VLDL e LDL). Deste modo, as HDL ao promoverem o efluxo de colesterol dos macrófagos células esponjosas previnem a acumulação excessiva de colesterol e a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos, melhorando a inflamação. As HDL ativam a sintetase endotelial do óxido nítrico (eNOS) para produzir NO, um potente vasodilatador, que melhora a função endotelial. Ao inibirem a expressão de moléculas de adesão, como a molécula de adesão intercelular (ICAM-1), a molécula de adesão celular vascular (VCAM-1), e a secreção de quimiocinas, as HDL inibem a adesão e a quimiotaxia de monócitos. A ativação do efluxo de colesterol pelas HDL via ABCA1 e ABCG1 controla ainda a proliferação de células hematopoiéticas. Adaptado. ⁽¹⁷⁾

4. AS HDL COMO ALVO TERAPÊUTICO

O fracasso das terapias recentes no aumento de HDL-C

Vários estudos epidemiológicos mostraram uma forte correlação inversa entre o colesterol-HDL (HDL-C) e o risco cardiovascular, sugerindo que os teores plasmáticos de HDL-C constituíam fortes preditores de eventos cardiovasculares. De facto, teores de HDL-C subnormais têm sido não só associados a uma maior incidência da doença cardíaca coronária, mas também a uma progressão mais agressiva da doença arterial coronária e a um maior risco de aterosclerose e de mortalidade por AVC isquémico. Estes dados conduziram à “Hipótese do HDL-C” segundo a qual intervenções terapêuticas que aumentassem os níveis de HDL-C poderiam reduzir potencialmente a ocorrência de eventos CV. Esta hipótese foi apoiada tanto em evidências como em estudos clínicos que demonstravam a capacidade das HDL de promoverem a regressão da aterosclerose quando os seus teores plasmáticos se encontravam aumentados. ^(11, 14-19)

Inesperadamente, tentativas recentes de aumentar os teores de HDL-C através da administração de fármacos, tais como a niacina ou inibidores da CEPT, que atuam através da diminuição do catabolismo das HDL, falharam significativamente na regressão da placa aterosclerótica e, mais importante, na redução do risco de eventos CV, particularmente quando combinados com estatinas. ^(14-16, 18, 19) Adicionalmente dados irrefutáveis provenientes de estudos genéticos contra a hipótese demonstraram que uma variante com perda de função no gene LIPG, que codifica a enzima lipase G endotelial, estava associada a teores de HDL-C significativamente elevados, mas tais teores não apresentavam proteção significativa contra o risco de enfarte de miocárdio. ^(16, 19)

Estas descobertas levaram à hipótese de que a composição e a função das HDL são mais importantes do que a quantidade de HDL-C para os seus efeitos benéficos nas DCV. Assim, em vez da medição das concentrações plasmáticas de HDL-C, tornam-se necessárias informações diretas sobre a composição e a função das HDL de modo a melhorar a avaliação do risco de DCV. ⁽¹⁵⁾

Existem, de facto, razões plausíveis para os resultados desapontantes das terapias dirigidas ao aumento dos teores plasmáticos de HDL-C:

- (i) Os teores plasmáticos de HDL-C não fornecem informações sobre o mecanismo do fluxo de colesterol dos macrófagos dos tecidos periféricos em direção ao fígado, o qual é influenciado por diversos fatores além da concentração de HDL-C.
- (ii) O aumento do catabolismo das HDL (através do aumento da expressão hepática de SR-BI) tem mostrado ser um regulador positivo do efluxo de colesterol dos macrófagos e células esponjosas, mesmo na presença de teores drasticamente reduzidos de HDL-C. No entanto, os inibidores da CEPT ou a niacina diminuem o catabolismo das HDL e, embora a concentração de HDL-C aumente, o efluxo de colesterol pode estar inalterado ou até mesmo diminuído. Além disto, estudos recentes demonstraram que a terapia combinada de estatinas com niacina não melhorava a funcionalidade das HDL, apesar do aumento significativo dos teores de HDL-C.
- (iii) Há uma forte evidência de que a inflamação modifica profundamente a composição, estrutura e função das HDL em circulação. A heterogeneidade funcional inerente às HDL plasmáticas deve-se, em grande parte, à sua composição diversificada. A depleção de fosfolípidos e o enriquecimento com proteínas pro-inflamatórias, como a proteína amiloide A sérica, leva à formação de HDL disfuncionais ou até mesmo pro-aterogénicas.

⁽¹⁵⁾

O conceito de HDL (dis)funcionais

Há aproximadamente duas décadas, uma equipa de investigadores reportou que as HDL anti-inflamatórias eram convertidas em partículas pro-inflamatórias durante a resposta inflamatória de fase aguda. Esta descoberta levou à criação do conceito de “índice inflamatório” para as HDL, definido como a capacidade relativa das HDL para inibirem a quimiotaxia de monócitos induzida por LDL oxidadas. ^(14, 17)

A partícula HDL pro-inflamatória foi caracterizada por possuir teores aumentados de SAA e teores reduzidos de apoA-I, PON1 e PAF-AH. Com base nos resultados de ensaios experimentais, as HDL foram reportadas como “disfuncionais” em relação à sua capacidade de regressão da placa aterosclerótica. Diferentes estudos demonstram que na ausência da CEPT, o colesterol esterificado das HDL não pode ser transferido para lipoproteínas, como as VLDL e as LDL, donde resulta a formação de HDLs com composição e funções alteradas no RCT. ^(14, 17)

Estes estudos demonstraram a necessidade de distinguir entre a perda de função e o “ganho” de disfunção. De facto, as HDL podem perder as suas propriedades anti-inflamatórias por completo e adquirir atividades pró-inflamatórias com ganho de disfunção. Estudos subsequentes revelaram que o grau de perda de função normal das HDL e o ganho de disfunção podem diferir em relação às diferentes atividades biológicas das HDL. ^(14, 17)

Uma vez que a funcionalidade das HDL se apresenta muito mais relevante para a proteção contra a aterosclerose e para a regressão da placa aterosclerótica, têm sido desenvolvidos estudos de modo a investigar quais os mecanismos moleculares que regulam os níveis plasmáticos de HDL e as suas funções. Neste âmbito, tem sido descrito que os miRNAs são potentes reguladores das vias génicas que controlam a biogénese de HDL, o efluxo de colesterol e também o RCT. ⁽¹⁹⁾

5. OS MICRORNAs E O METABOLISMO DAS HDL

Os microRNAs (miRNA ou miR) são uma classe de *small-RNAs* (sRNA), de cadeia simples com aproximadamente 22 nucleótidos de comprimento, que regulam negativamente a expressão génica. Os miRNA atuam através da ligação à região 3' não traduzida (UTR) de RNAs mensageiros (mRNA) alvo, resultando na sua degradação ou supressão da tradução. ^(2, 4, 19-28)

Os miRNAs são normalmente transcritos no núcleo pela RNA polimerase II (Pol II), de modo idêntico aos mRNAs, e posteriormente processados pela Droscha, um complexo (RNase III)/DGCR8, através da qual são formados miRNA pre-maduros (pre-miRNA). Os pre-miRNA

são então transportados para o citoplasma através da exportina-5, com consumo de ATP, onde são processados pela Dicer (uma endonuclease específica de miRNAs), resultando na conversão em miRNAs de dupla cadeia, ou seja, em miRNAs maduros de 18-25 nucleótidos de comprimento. Subsequentemente, os miRNAs maduros são incorporados num complexo RISC (*RNA-inducing silencing complex*), encontrando-se agora prontos para exercerem as suas funções inibidoras, através da degradação do mRNA alvo ou através da inibição da síntese proteica (Figura 8). (2, 4, 21, 23-25, 29)

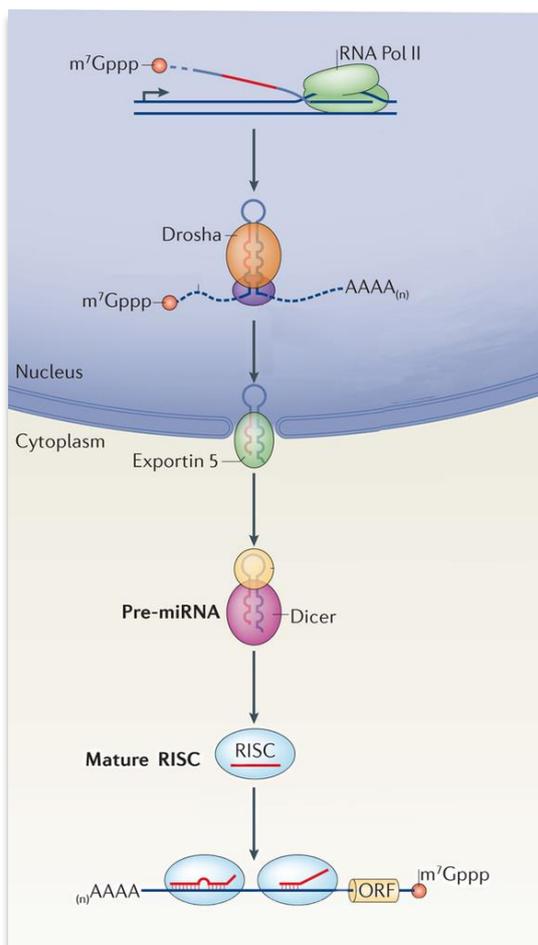


Figura 8 – Biogénese de miRNA. Os miRNA são transcritos pela RNA Pol II e posteriormente processados pela Drosha, formando pre-miRNAs que saem do núcleo, através exportina-5 com consumo de ATP, em direção ao citoplasma. Aqui são processados pela Dicer, originando miRNAs maduros, de dupla cadeia, que são posteriormente incorporados no complexo RISC. Neste ponto os miRNA encontram-se prontos para se ligarem ao mRNA alvo, exercendo as suas funções inibidoras através quer da degradação deste mRNA quer da inibição da síntese proteica. Adaptado (4, 25, 29)

Os miRNAs encontram-se envolvidos na regulação génica de vários processos biológicos, tais como a resposta imunitária e a diferenciação celular, tendo sido demonstrado que mais de 60% dos genes codificadores de proteínas são regulados por miRNAs. Mais recentemente, foi demonstrada a sua ação, particularmente, em processos subjacentes às DCV, como a homeostase do colesterol, inflamação e *stress oxidativo*. (4, 19-27)

De facto, vários estudos realizados nos últimos anos têm demonstrado que os miRNAs controlam a expressão da grande maioria de genes associados ao metabolismo das HDL, incluindo a regulação dos transportadores ABCA1, ABCG1 e do recetor SR-BI, entre outros.

Estas descobertas sugerem que os miRNAs regulam a biogénese das HDL, o efluxo de colesterol das células e a captação das HDL pelo seu recetor no fígado, controlando deste modo todas as etapas do transporte reverso de colesterol. (4, 19-21, 26-27)

Como já referido anteriormente, sabe-se ainda que as lipoproteínas, nomeadamente as HDL, transportam miRNAs funcionais no plasma. Uma vez que têm sido detetados níveis alterados de miRNAs em circulação na síndrome coronária aguda, insuficiência cardíaca, hipertensão, AVC e noutras patologias vasculares, os miRNAs das HDL (HDL-miRNA) constituem uma nova classe de biomarcadores para as DCV. (2, 4, 20-24, 30-32) O uso de miRNAs extracelulares como biomarcadores apresenta vários benefícios, como a facilidade de recolha de amostras de modo não invasivo, uma vez que se encontram em todos os fluidos biológicos, os miRNAs apresentam uma estabilidade elevada e um tempo de meia-vida relativamente elevado nas amostras recolhidas e, ainda, uma especificidade elevada para as sondas já disponíveis. (20) Além disto, foi descrito que as HDL transportam os miRNAs até às células recetoras, onde regulam a expressão génica, incluindo a expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais. (2, 20-22, 30-32)

Assim, os miRNAs constituem mediadores bioativos da comunicação intercelular e representam novos alvos terapêuticos e novas estratégias terapêuticas para prevenir e tratar as DCV. (20-26)

Como referido anteriormente, vários estudos têm demonstrado que os miRNAs atuam como reguladores críticos da biogénese de HDL e do efluxo de colesterol, controlando deste modo os teores plasmáticos de HDL-C e o transporte reverso de colesterol, através do qual o excesso de colesterol celular é removido dos tecidos periféricos e transportado em direção ao fígado, onde é excretado. (2, 4, 19-21)

As HDL nascente são formadas no fígado através do efluxo de colesterol e de fosfolípidos dos hepatócitos para a formação de apoA-I pobres em lípidos. O transportador ABCA1 na membrana plasmática desempenha um papel crítico neste processo, uma vez que controla o efluxo de colesterol celular para as apoA-I. (2, 19, 24, 26)

Recentemente, foram identificados vários miRNAs que têm como alvo o ABCA1 e, deste modo, regulam os teores plasmáticos de HDL-C, incluindo miR-33, miR-758, miR-26, miR-106, miR-144, miR-121-1e miR-148a. Assim, estes miRNAs atuam através da redução do efluxo de colesterol para as apoA-I, e a sua inibição tem sido reportada como uma estratégia para aumentar esse efluxo. De facto, a inibição dos miR-33, miR-144, miR-128 e miR-148a em ratos ou macacos tem demonstrado originar o aumento significativo dos teores plasmáticos de HDL-C. (2, 19, 21, 24, 26) Estes teores são também regulados através da clearance hepática do colesterol

das HDL via SR-BI, que tem sido identificado como alvo dos miR-223, miR-455-5p, miR-96, miR-185 e miR-125a. ^(2, 19)

A relevância da família miR-33

A família miR-33 é constituída por dois membros, o miR-33a e miR-33b, que diferem em apenas 2 nucleótidos na sua forma madura. Desta forma, prevê-se que os miR-33a e miR-33b tenham como alvo um subconjunto de genes semelhante. ^(19, 26)

Os miR-33a e miR-33b foram os primeiros a serem descobertos, mostrando-se intrigantes devido ao seu contexto genómico: os miR-33a e miR-33b encontram-se incorporados nas regiões intrónicas dos genes *SREBR2* e *SREBF1* que codificam, respetivamente, os fatores de transcrição *SREBP2* e *SREBP1* (*sterol regulatory element-binding proteins*), que controlam a expressão de genes envolvidos na síntese de colesterol e ácidos gordos. O facto de os miR-33a e b serem co-transcritos com o respetivo gene onde estão inseridos sugere que estes miRNAs regulam a homeostase lipídica juntamente com estes genes. Portanto, a transcrição de *SREBF1* e *SREBF2* também resulta na expressão de miR-33a/b, cooperando no balanço dos teores celulares de lípidos através da repressão de genes que se opõem às funções dos *SREBP*, como por exemplo, os genes envolvidos no efluxo de colesterol e na oxidação de ácidos gordos. ^(2, 4, 19, 21)

A grande importância dos miR-33 na regulação da homeostase do colesterol está associada à forte repressão do mRNA do transportador *ABCA1* como resultado da sobre-expressão destes miRNAs em várias células, em particular nos hepatócitos e macrófagos. Embora o papel dos *ABCA1* no fígado seja essencial para a biogénese de HDL, a expressão de *ABCA1* nos macrófagos é também crítica para o transporte reverso de colesterol. Recentemente, foi reportado que a sobre-expressão de miR-33 nos macrófagos reduzia a expressão de *ABCA1* (e de *ABCG1* em ratos, mas não humanos) e, deste modo, o efluxo de colesterol mediado por apoA-I encontrava-se diminuído. Por outro lado, verificou-se que a inibição dos miR-33 endógenos nos macrófagos aumentava a expressão destes transportadores ABC e consequentemente o efluxo de colesterol dos macrófagos/células esponjosas para as apoA-I e HDLs, tendo sido destacada a importância do miR-33 neste processo. ^(2, 4, 19-21)

De facto, o tratamento de macacos e murganhos com anti-miR-33 originou o aumento da expressão de *ABCA1* e dos teores plasmáticos de HDL-C e apoA-I, demonstrando o seu efeito ateroprotetor. Mais importante, as HDL isoladas dos macacos tratados com anti-miR-33 mostraram conservar as suas propriedades anti-inflamatórias, particularmente a capacidade de

promover o efluxo de colesterol dos macrófagos e de proteger as células endoteliais da inflamação induzida por citocinas. ^(2, 4, 19-21)

A destacar, ainda, noutro estudo com murganhos, a inibição *antisense* de miR-33a levou à regressão da placa aterosclerótica através da promoção do transporte reverso de colesterol. A promoção deste processo foi conseguida de duas maneiras: através do aumento direto da biogénese de HDL e através do aumento da capacidade de efluxo de colesterol nos macrófagos e células esponjosas presentes na placa, resultando numa diminuição da acumulação lipídica nas áreas ateroscleróticas. Além disto, o aumento dos níveis de HDLs funcionais também contribuiu para a redução da progressão da placa aterosclerótica. ^(2, 4, 19, 21) Por outro lado, existem evidências de que a inibição do miR-33 leva à diminuição da hepatotoxicidade associada ao tratamento com sinvastatina, sugerindo que a terapia combinada entre miR-33 e estatinas poderá ser benéfica. ⁽²⁰⁾

Embora estes estudos pré-clínicos sejam encorajadores, foi observado o desenvolvimento de obesidade e esteatose hepática em murganhos deficientes em miR-33a. Aliás, foi demonstrado que a inibição crónica de miR-33a por oligonucleótidos *antisense* aumentou a expressão de genes envolvidos na síntese de ácidos gordos. Assim, o potencial efeito adverso observado, a hepatoesteatose, em consequência da terapia com anti-miR-33 torna-se num obstáculo crítico à aplicação desta terapia em humanos. ^(2, 4, 20) Deste modo, permanecem ainda várias questões por clarificar, nomeadamente, quais os efeitos da supressão do miR-33, quais os mecanismos compensatórios adjacentes que podem ser ativados durante a inibição deste miRNA, isto é, a regulação positiva por outros miRNAs cujo alvo seja também o ABCA1. Estes fatores devem ser tidos em consideração, bem como a segurança sistémica da terapia e a vectorização dos miRNAs para as células ou tecidos de modo a que se consiga um efeito benéfico maior. ^(19, 20)

Apesar disto, a capacidade dos miRNAs de regularem múltiplos genes torna-os alvos terapêuticos atraentes, e, sendo a terapia baseada na manipulação de miRNA bastante promissora, uma vez que estes atuam de modo complexo e em várias etapas da doença. Na aterosclerose, em particular, a inibição de miR-33 vai atuar em várias etapas do transporte reverso de colesterol, aumentando a biogénese de HDL, o efluxo de colesterol dos macrófagos da placa e a excreção hepática de colesterol, sendo, deste modo, considerada uma terapia potencialmente promissora. ^(2, 4, 19-21, 23-27)

6. ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS BASEADAS NA MANIPULAÇÃO DE MIRNAS

As estratégias terapêuticas baseadas em miRNAs podem ser divididas em duas categorias: a inibição (ou bloqueio) de miRNAs de modo a reduzir a expressão de miRNAs sobre-expressos num processo patológico, e a reposição de miRNAs cuja expressão se encontra reprimida associada a uma patologia (Figura 9).^(4, 20)

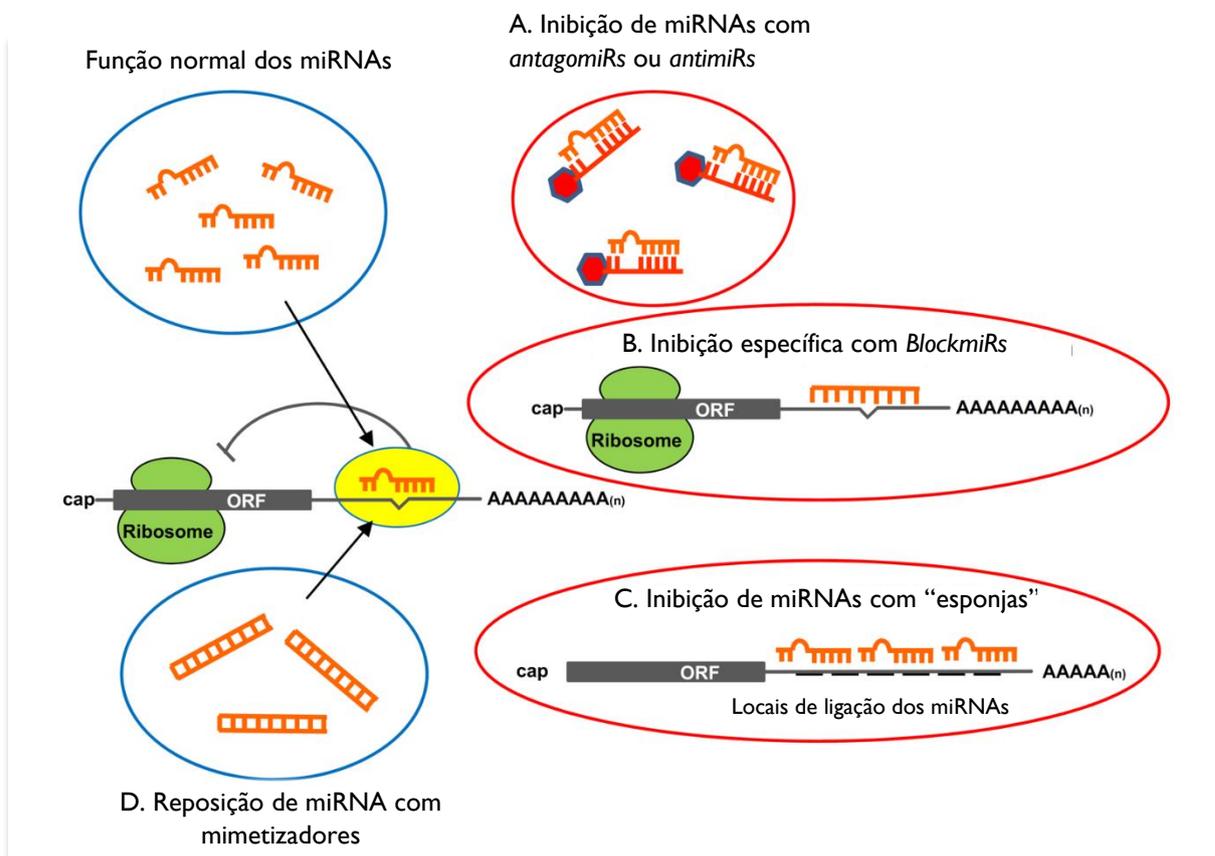


Figura 9 – Estratégias de manipulação de miRNAs. A modificação dos miRNAs pode ser conseguida através de várias estratégias. As linhas a azul indicam os métodos que diminuem a expressão do gene alvo e as linhas a vermelho as abordagens que aumentam a sua expressão. **A.** Inibição de miRNAs com *antagomiRs* ou *antimiriRs*; **B.** Inibição específica com *blockmiRs*; **C.** Inibição de miRNAs com “esponjas”; **D.** Reposição de miRNA com mimetizadores. Adaptado.⁽⁴⁾

Inibição da função de miRNAs

As estratégias atuais para inibir miRNAs incluem o uso de inibidores de miRNA e de “esponjas” de miRNA. Um inibidor de miRNA ideal necessita de ter várias funções, incluindo alta afinidade para o gene alvo, baixa toxicidade, elevada especificidade, resistência às endonucleases e baixo custo de síntese.^(4, 19, 20, 25)

Oligonucleótidos *antisense*

Os inibidores de miRNA são oligonucleótidos *antisense* modificados quimicamente (ASOs) que se apresentam complementares ao miRNA maduro. Atualmente, já foram sintetizados vários anti-miRNAs, designadamente *antagomiRs*, cujo alvo é um único miRNA conjugado com colesterol; *antimiRs*, cujo alvo é um único miRNA; e pequenos *antimiRs*, cujo alvo são famílias de miRNAs. Estes ASOs conseguem reduzir os níveis de miRNAs expressos de um modo patológico. ^(4, 20)

A farmacodinâmica e farmacocinética dos ASOs têm sido melhoradas através de modificações químicas, sendo as mais comuns 2'-*O-methoxyethyl* (2'-MOE), 2'-*O-methyl ribose-modified RNA* (2'-OMe), 2'-*fluoro* (2'-F) e *locked nucleic acid* (LNA). A inibição dos miR-33a/b em macacos, através da administração de um oligonucleótido *antisense* (2'-F/MOE-modified phosphorothioate-backbone-modified *antisense*) originou o aumento da expressão hepática do transportador ABCA1 e o subsequente aumento os teores plasmáticos de HDL-C após 12 semanas. ⁽⁴⁾ Em particular, a adição de LNAs aos ASOs demonstrou aumentar a sua especificidade de ligação aos miRNAs alvo. Os LNAs deram origem a *tiny LNAs*, com 7-8 nucleótidos de comprimento, caracterizados pela sua capacidade de inibirem simultaneamente uma família de miRNAs, enquanto que os *antagomiRs* apenas são capazes de inibir individualmente os miRNAs alvo. Recentemente, foi demonstrado que a inibição farmacológica da família miR-33 por um *antimiR* LNA de 8 monómeros modificado administrado subcutaneamente em primatas não-humanos obesos e insulino-resistentes provocou a inibição repressão da expressão dos alvos do miR-33, tais como o transportador ABCA1, donde resultou o aumento dos teores plasmáticos de HDL-C. ^(4, 19-23)

Recentemente, foi desenvolvido um outro tipo de inibidor de miRNAs, referidos como *blockmiRs*, cujo alvo é o local de ligação do miRNA de um gene alvo específico. Ou seja, ligam-se a uma região específica de um gene específico, à qual o miRNA se ligaria, bloqueando assim a sua ação. A característica única dos *blockmiRs* é que bloqueia a ligação do miRNA a um mRNA específico, permitindo que o mesmo miRNA regule outros genes alvo. ^(4, 20)

“Esponjas” de miRNA

As “esponjas” de miRNA caracterizam-se como inibidores competitivos para a ligação de miRNAs ao mRNA alvo, uma vez que apresentam múltiplos locais de ligação a miRNAs, impedindo deste modo que se liguem ao mRNA. ^(2, 4, 20)

Esta tecnologia utiliza principalmente vetores virais para a transferência direcionada de miRNA *sponges* em células alvo, podendo também ser usados sistemas não-virais, como lipossomas, polissacáridos e polímeros artificiais. ^(2, 4, 20)

Reposição dos níveis de miRNA

Embora nos últimos anos o principal foco da terapia baseada em miRNAs tenha caído sobre a inibição de miRNAs sobre-expressos associados a uma patologia, várias estratégias bem-sucedidas têm sido utilizadas para expressar miRNAs sob-expressos ou até mesmo silenciados de células ou tecidos. Os níveis de miRNAs podem ser repostos principalmente através do uso de mimetizadores de miRNAs baseados em oligonucleótidos, que consistem em oligonucleótidos sintéticos de dupla cadeia que se assemelham aos pre-miRNA. ^(2, 4, 20, 23)

7. CONCLUSÃO

Os estudos e trabalhos realizados nas últimas décadas destacam o papel proeminente dos miRNA na regulação da homeostase do colesterol, particularmente, na regulação do metabolismo das HDL. Estes estudos demonstram o papel crucial dos miRNAs na regulação pós-transcricional da expressão do transportador ABCA1 e também de múltiplos genes envolvidos na biogénese de HDL, do efluxo de colesterol das células, controlando deste modo todas as etapas do transporte reverso de colesterol. ^(4, 19-21, 31)

Apesar dos ainda, relativamente, poucos conhecimentos acerca dos miRNAs envolvidos no metabolismo lipídico e na aterosclerose, existe atualmente um enorme interesse neste tema e uma enorme oportunidade para o seu desenvolvimento; aliás, já se encontram em desenvolvimento vários estudos clínicos com inibidores e mimetizadores de miRNAs. ^(20, 31)

De facto, a capacidade singular dos miRNAs de inibirem uma vasta rede de genes envolvidos muitas vezes em patologias complexas, como é o caso da aterosclerose, oferece uma estratégia única para o tratamento destas doenças através da modulação desses mesmos genes. Apesar destas características entusiasmantes, o facto de os miRNAs apresentarem como alvo vários genes, potencia a ocorrência de efeitos adversos como consequência da sua ação sobre outros genes que não são do interesse no contexto do tratamento da doença. Deste modo, são ainda necessários estudos adicionais, principalmente sobre a segurança sistémica desta terapia. ^(2, 31)

Por outro lado, vários estudos demonstram que as lipoproteínas, nomeadamente as HDL e as LDL, transferem miRNAs para as células dos tecidos periféricos, onde podem exercer a sua função inibidora da expressão de determinados genes, constituindo uma forma de comunicação

intercelular. De referir que tais miRNAs associados a estas lipoproteínas podem-se encontrar significativamente alterados em vários estados patológicos, incluindo nas DCV, o que torna os miRNAs potenciais biomarcadores e/ou alvos terapêuticos para estas doenças. ⁽²⁰⁾

Uma vez que a família miR-33 tem como alvos vários genes chave que regulam não só o metabolismo das HDL, a sua função e o efluxo celular de colesterol, a inibição deste subconjunto de RNAs não codificantes representa uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento da aterosclerose. ^(4, 20, 31)

Deste modo, novas estratégias terapêuticas que explorem o silenciamento de genes dependente de miRNAs oferecem um novo e promissor futuro para a terapia das DCV. ^(4, 31)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. **Cardiovascular diseases (CVDs)**. 2017. [Acedido a 3 de julho de 2017]. Disponível na Internet: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>
2. FEINBERG, MW., MOORE KJ. – **MicroRNA regulation of atherosclerosis**. *Circulation Research*. 118, 4 (2016), 703-720.
3. BURNETT, JR. – **Lipids, Lipoproteins, Atherosclerosis and Cardiovascular Disease**. *The Clinical Biochemist, Reviews*. 25, 1 (2004), 2.
4. ONO, K. – **Functions of microRNA-33a/b and microRNA therapeutics**. *Journal of Cardiology*. 67, 1 (2016), 28-33.
5. **Atheromas Are Caseous Abscesses**. In: *Inflammatory Atherosclerosis: characteristics of the Injurious Agent*, FRINK, RJ.. Sacramento (CA): Heart Research Foundation, 2002. ISBN-10: 0-9724816-0-5.
6. WEBER C., NOELS H. – **Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options**. *Nature Medicine*. 17, 11 (2011), 1410-1422.
7. REIS, PEO., BOROJEVIC, R., BALOTTIN, L., REIS, IFO. – **Etiopatogenia e Evolução da Doença Aterosclerótica**. In: *Cirurgia Vascular Endovascular Angiologia*, 3 ed.. Revinter, 2013. 91-100.
8. BURNETT, JR. – **Coronary Artery Disease: Lipid Metabolism**. In: *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*, 5th ed, KAPLAN, LA., PESCE, AJ. Editors. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier, Inc, 2010. ISBN: 978-0-323-03658-0, 691-728.
9. **Sistema Cardiovascular**. In: *Histologia e Biologia Celular, Uma introdução à Patologia*, 2 ed, KIERSZENBAUM, AL.. Rio Janeiro: Elsevier Editora Lda, 2008. ISBN: 978-85-352-2513-6, 355-374.
10. LUSIS, AJ. – **Atherosclerosis**. *Nature*. 407 (2000), 233-241.
11. RACHED, FH., CHAPMAN, MJ., KONTUSH, A. – **HDL particle subpopulations: Focus on biological function**. *BioFactors*. 41, 2 (2015), 67-77.
12. LIMA, ES., COUTO, RD. – **Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade**. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 42, 3 (2006), 169-178.
13. CHOI, HY., HALFIANE, A., SCHWERTANI, A., GENEST, J. – **High-Density Lipoproteins: Biology, Epidemiology, and Clinical Management**. *The Canadian Journal of Cardiology*. 33, 3 (2017), 325-333.
14. FISHER, EA., FEIG, JE., HEWING, B., HAZEN, SL., SMITH, JD. – **HDL Function, dysfunction, and Reverse Cholesterol Transport**. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 32, 12 (2012), 2813-2820.
15. BIRNER-GRUENBERGER, R., SCHITRMAYER, M., HOLZER, M., MARSCHKE, G. – **Understanding high-density lipoprotein function in disease: recent advances in proteomics unravel the complexity of its composition and biology**. *Progress in Lipid Research*. 56 (2014), 36-46.

16. TUTEJA, S., RADER, DJ. – **High-Density Lipoproteins in the Prevention of Cardiovascular Disease: Changing the Paradigm.** *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* 96, 1 (2014), 48-56.
17. ROSENSON, RS., BREWER, HB., ANSELL, BJ., BARTER, P., CHAPMAN, MJ., HEINECKE, JW., KONTUSH, A., TALL, AR., WEBB, NR. – **Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease.** *Nature Reviews Cardiology.* 13, 1 (2015), 48-60.
18. KLANCIC, T., WOODWARD, L., HOFMANN, SM., FISHER, EA. – **High density lipoprotein and metabolic disease: Potential benefits of restoring its functional properties.** *Molecular Metabolism.* 5, 5 (2016), 321-327.
19. RAYNER, KJ., MOORE, KJ. – **MicroRNA Control of High-Density Lipoprotein Metabolism and Function.** *Circulation Research.* 114, 1 (2014), 183-192.
20. MICHELL, DL., VICKERS, KC. – **HDL and microRNA therapeutics in cardiovascular disease.** *Pharmacology & Therapeutics.* 168 (2016), 43-52.
21. MADRIGAL-MALUTE, J., ROTLLAN, N., ARANDA, JF., FERNÁNDEZ-HERNANDO, C. – **MicroRNAs and atherosclerosis.** *Current Atherosclerosis Report.* 15, 5 (2013), 322.
22. SANDOVITO, D., EGEE, V., WEBER, C. – **Small but smart: MicroRNAs orchestrate atherosclerosis development and progression.** *Biochimica et Biophysica Acta.* 1861 (2016), 2017-2086.
23. OLSON, EN. – **MicroRNAs as therapeutic targets and biomarkers of cardiovascular disease.** *Science Translational Medicine.* 6, 239 (2014).
24. JEON, TI., OSBORNE, TF. – **miRNA and cholesterol homeostasis.** *Biochimica et Biophysica Acta.* 1861, 12, part B (2016), 2041-2046
25. KWEKKEBOOM, RF., DOEVENDANS, PA., MUSTERS, RJ., SLUIJTER, JP. – **Targeted delivery of miRNA therapeutics for cardiovascular diseases: opportunities and challenges.** *Clinical Science (London, England: 1979).* 127, 6 (2014), 351-365.
26. RAYNER, KJ., FERNÁNDEZ-HERNANDO, C., MOORE, KJ. – **MicroRNAs regulate lipid metabolism in atherogenesis.** *Thrombosis and Haemostasis.* 107, 4 (2012), 642-647.
27. ONO, K., KUWABARA, Y., HAN, J. – **MicroRNAs and cardiovascular diseases.** *The FEBS journal.* 278, 10 (2011), 1619-1633.
28. RUPAIMOOLE, R., HAN, HD., LOPEZ-BERESTEIN, G., SOOD, AK. – **MicroRNA therapeutics: principles, expectations, and challenges.** *Chinese Journal of Cancer.* 30, 6 (2011), 368-370.
29. AMERES, SL., ZAMORE, PD. – **Diversifying microRNA sequence and function.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 14 (2013), 475-488.
30. MICHELL, DL., VICKERS, KC. – **Lipoprotein carriers of microRNAs.** *Biochimica et Biophysica Acta.* 1861 (2016), 2069-2074.

31. CANFRÁN-DUQUE, A., LIN, C., GOEDEKE, L., SUÁREZ, Y., FERNÁNDEZ-HERNANDO, C. – **microRNAs and HDL Metabolism**. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 36, 6 (2016), 1076-1084.
32. DESGASNÉ, V., BOUCHARD, L., GUÉRIN, R. – **microRNAs in lipoprotein and lipid metabolism: from biological function to clinical application**. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 55, 5 (2017) 667-686.