



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



José Miguel Martins Teixeira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “H4R como um Novo Alvo na Terapia Anticarcinogénica” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dra. Catarina Coelho, da Dra. Susana Sousa e do Professor Doutor Alcino Leitão apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2018

José Miguel Martins Teixeira

RELATÓRIOS DE ESTÁGIO E MONOGRAFIA
INTITULADA “H4R COMO UM NOVO ALVO NA
TERAPIA ANTICARCINOGENICA” REFERENTES À
UNIDADE “ESTÁGIO CURRICULAR”.

Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas orientada pela Dra. Catarina Coelho,
Dra. Susana Sousa e pelo Professor Doutor Alcino Leitão, apresentada à Faculdade de
Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2018



Eu, José Miguel Martins Teixeira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2012153472, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “H4R como um novo alvo na terapia anticarcinogénica” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 7 de setembro de 2018.


(José Miguel Martins Teixeira)

Agradecimentos

Quero em primeiro lugar agradecer a toda a minha família, que sempre me ajudou a traçar o meu percurso, demonstrando um enorme carinho e disponibilidade em todos os momentos. Sem eles nada disto seria possível.

A todos os meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado e também a todos os que fui conhecendo durante este percurso e que são, também hoje, família.

A todos os orientadores, pelo apoio e disponibilidade demonstrados nesta importante fase e também a todos os profissionais que conheci e com quem tive oportunidade de trabalhar durante os últimos meses.

A Coimbra e, em especial, à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, onde vivi momentos que nunca irei esquecer e que vão deixar saudades.

ÍNDICE

Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Hospitalar	1
1. Notas Introdutórias	2
2. Administração Regional de Saúde do Centro, I.P.....	2
2.1. Gabinete de Farmácia e Medicamento	3
3. Análise SWOT	4
3.1. Pontos Fortes (S).....	4
3.2. Pontos Fracos (W).....	8
3.3. Oportunidades (O).....	9
3.4. Ameaças (T).....	11
4. Considerações Finais	12
PARTE II – Relatório de estágio em Farmácia Comunitária	13
1. Notas introdutórias	14
2. Análise SWOT	15
2.1. Pontos fortes (S).....	15
2.2. Pontos fracos (W).....	18
2.3. Oportunidades (O)	20
2.4. Ameaças (T)	22
3. Considerações finais	23
Referências bibliográficas – Parte I e II	24
Parte III – Monografia intitulada “H4R como um novo alvo na terapia anticarcinogénica”	25
1. Introdução.....	26
2. A histamina e os seus recetores.....	27
3. A histamina e a proliferação celular.....	28
4. Efeito de ligandos dos H4R em modelos experimentais de cancro	29
4.1. Cancro da mama	29
4.2. Melanoma	37
5. Recetores H4 e pesquisa de novos ligandos.....	45
6. Considerações Finais.....	48
Referências bibliográficas – Parte III	49

Resumo – Monografia intitulada “H4R como um novo alvo na terapia anticarcinogénica”

O cancro continua a ser um problema de saúde de elevada incidência, sendo responsável por 1 em cada 7 mortes a nível global. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, em 2012, foram diagnosticados aproximadamente 14.1 milhões de novos casos e 8.2 milhões de mortes relacionadas com o cancro, sendo que as estimativas atuais apontam para que, no ano 2030, o número de novos casos subirá para 21.6 milhões.

A descoberta do receptor H₄ da histamina e da sua presença em diferentes tipos de tecidos e linhas celulares malignas, levou à suposição do seu envolvimento nos processos de proliferação celular, angiogénese, imunossupressão e metastização. Assim, numerosos núcleos de investigação têm concentrado esforços na avaliação da atividade farmacológica de ligandos dos H4R em modelos experimentais, de forma a encontrar novas abordagens na terapia desta doença.

Palavras-chave: Cancro; Recetor; Histamina; Proliferação celular; Terapia.

Abstract – Thesis titled “H4R as a new target on cancer therapy”

Cancer continues to be a major health problem, accounting for 1 in 7 deaths worldwide. According to the World Health Organization, in 2012, approximately 14.1 million new cases were diagnosed and 8.2 million cancer-related deaths occurred, with current estimates pointing to 21.6 million of new cases in 2030.

The discovery of the histamine H₄ receptor and its presence in different tissue types and malignant cell lines has led to the assumption of its involvement in the processes of cell proliferation, angiogenesis, immunosuppression and metastasis. Thus, numerous research institutes have been struggling to evaluate the pharmacological activity of H4R ligands in experimental models, in order to find new approaches in the therapy of this disease.

Keywords: Cancer; Receptor; Histamine; Cell proliferation; Therapy.

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

Parte I e II – Relatórios de estágio em Farmácia Hospitalar e Farmácia Comunitária

ACeS – Agrupamentos de Centros de Saúde

AOs – Assistentes Operacionais

ARSC, I.P. – Administração Regional de Saúde do Centro, Instituto Público

CCF – Centro de Conferência de Faturas

CDP – Créditos de Desenvolvimento Profissional

CHNM – Código Hospitalar Nacional do Medicamento

CSP – Cuidados de Saúde Primários

DCI – Designação Comum Internacional

DGS – Direção Geral de Saúde

DM – Dispositivos Médicos

DPC – Departamento de Planeamento e Contratualização

DSP – Departamento de Saúde Pública

FC – Farmácia Comunitária

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

GFM – Gabinete de Farmácia e Medicamento

INFARMED, I.P. – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, Instituto Público

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

IVA – Imposto sobre o Valor Acrescentado

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamentos não sujeitos a receita médica

MSCE – Medicamentos Sujeitos a Controlo Especial

MSRM – Medicamentos sujeitos a receita médica

OF – Ordem dos Farmacêuticos

PNV – Plano Nacional de Vacinação

PPCIRA – Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos

RCM – Resumo das características dos Medicamentos

SGICM – Sistema de Gestão Integrada do Circuito do Medicamento

SNS – Serviço Nacional de Saúde

SWOT – *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*

TDTs – Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica

UALP – Unidade de Aprovisionamento, Logística e Patrimônio

UCCs – Unidades de Cuidados Continuados

UFs – Unidades Funcionais

USF – Unidade de Saúde Familiar

Parte III - Monografia “H4R como um novo alvo na terapia anticarcinogénica”

BrdU – 5-bromo-2'-deoxiuridina

cAMP – Adenosina monofosfato cíclica

H1R – H4R – Recetores da histamina H1, H2, H3 e H4

HDC – Descarboxilase da L-histidina

IM – Índice mitótico

MAPK – Proteínas quinase ativadas por mitógenos

PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular

PBS – Tampão fosfato-salino

R&D – *Research and Development*

siRNA – RNA *small interfering*

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

**PARTE I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA
HOSPITALAR**

I. NOTAS INTRODUTÓRIAS

Este relatório, realizado no âmbito da unidade “Estágio Curricular”, inserida no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), consiste numa reflexão acerca do período de cerca de 8 semanas que permitiu o conhecimento do trabalho do farmacêutico como profissional de saúde na área da Farmácia Hospitalar, mais precisamente no órgão público de saúde que é a Administração Regional de Saúde do Centro, I.P. (ARSC, I.P.). Durante este tempo, foi-me dada a oportunidade de integrar a equipa de trabalho constituída por Farmacêuticos, Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica (TDTs) e Assistentes Operacionais (AOs), da Farmácia Central do Gabinete de Farmácia e Medicamento - Serviços Farmacêuticos da ARSC, I.P..

A escolha deste estágio advém de uma vontade de integrar uma equipa de farmacêuticos de carreira hospitalar e perceber como o seu trabalho é importante na missão de fazer chegar, de melhor forma possível e de modo igualitário ao utente, os cuidados de saúde, dando primazia à utilização correta do medicamento.

O presente relatório é realizado com recurso a uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), permitindo assim ao leitor, de forma clara e objetiva, entender o modo de funcionamento da instituição, o trabalho executado pelo estagiário e o que de maior importância foi retido durante este período e que poderá ser utilizado em situações futuras de trabalho na área farmacêutica. Cada tópico constante nesta análise está devidamente identificado pelas iniciais S, W, O e T, referentes ao acrónimo SWOT.

2. ADMINISTRAÇÃO REGIONAL DE SAÚDE DO CENTRO, I.P.

A ARSC, I.P. é “uma pessoa coletiva de direito público, integrada na Administração Indireta do Estado, dotada de personalidade jurídica e autonomia administrativa, financeira e patrimonial”.¹

À luz do Decreto-Lei nº22/2012, a ARSC é constituída por serviços centrais e por serviços desconcentrados como é o caso dos Agrupamentos de Centros de Saúde (ACeS) que, em íntima ligação, “têm por missão garantir à população da respetiva área geográfica de intervenção o acesso à prestação de cuidados de saúde de qualidade, adequando os recursos disponíveis às necessidades em saúde bem como cumprir e fazer cumprir o Plano Nacional de Saúde na sua área de Intervenção”.¹

2.1. GABINETE DE FARMÁCIA E MEDICAMENTO

O Gabinete de Farmácia e Medicamento (GFM), tal como as equipas e outros Gabinetes de apoio especializado integrantes da instituição, depende hierarquicamente do Conselho Diretivo da ARSC, I.P., estando as suas competências incluídas no Artigo 61º do DR, 2ª série - nº 35 - 19 de Fevereiro de 2013. No seu âmbito de intervenção consta a atividade farmacêutica relacionada com a “organização e gestão, farmácia clínica/informação/formação, o apoio técnico e a farmacoeconomia e qualidade.”

Este gabinete é constituído pelos seguintes serviços:

- Gabinete de coordenação
- Farmácia Central
- Gabinetes desconcentrados – ACeS

A Farmácia Central do GFM da ARSC, I.P. localiza-se no Alto da Relvinha, em Coimbra, e a sua coordenação é efetuada pela Dr.ª Catarina Coelho. Os recursos humanos da Farmácia Central incluem 5 farmacêuticas, cada uma com um ACeS atribuído, 4 TDTs e 6 AOs.

Este local onde desenvolvi o meu trabalho como estagiário é o núcleo local de todo o processo logístico onde se centram os processos de aprovisionamento, gestão e envio de todos os medicamentos, dispositivos médicos e outros produtos de saúde para as Unidades Funcionais (UFs). A condensação de todos os armazéns, anteriormente dispersos pela região centro (12 no total), veio trazer vantagens tanto a nível económico, pela diminuição do valor de rendas pagas, bem como a nível do controlo interno dos stocks, com diminuição de desperdícios e maior eficácia na distribuição adequada de todos os recursos necessários à prática clínica, com mais relevância os medicamentos, vacinas e dispositivos médicos (DM). Adicionalmente, beneficiou-se também pela união de um grupo de profissionais de saúde experiente e capaz de responder às necessidades e problemas emergentes.

Os 78 conselhos abrangidos pela ARSC, I.P. contam com a existência de 6 serviços desconcentrados (os ACeS), 12 unidades hospitalares (das quais 5 são centros hospitalares e 3 estão integrados em 2 Unidades Locais de Saúde - ULS), cerca de 300 Unidades de Saúde (UF), 5 Centros de Diagnóstico Pneumológico (CDP), 2 Serviços de Urgência Básica (SUB), 2 ambulâncias de Suporte Imediato de Vida (SIV), 3 Unidades de Internamento (Comunidade Terapêutica Arco-Íris, Unidade de Alcoologia e Unidade de Desabituação), 6 Centros de Resposta Integrada (CRI) e 122 locais de distribuição direta de metadona.

O GFM da ARSC, I.P., apresenta assim, como responsabilidades:

- Supervisão técnica das aquisições de medicamentos, dispositivos médicos e outros produtos de saúde necessários às UF, com responsabilidades na qualidade, acondicionamento, distribuição e utilização;
- Garantir a permanente atualização dos dados constantes no Sistema de Gestão Integrada do Circuito do Medicamento (SGICM);
- Garantir a satisfação das requisições a todas as UF na área de abrangência da ARSC, I.P.;
- Coordenar a atividade farmacêutica desenvolvida nos serviços desconcentrados, garantindo o uso racional, seguro e eficaz dos medicamentos, dispositivos médicos e vacinas;
- Apoio e coordenação com o Departamento de Saúde Pública (DSP) nos programas de promoção, prevenção e proteção da saúde;
- Integração de comissões técnico-científicas com vertente clínica/farmacêutica;
- Elaboração de pareceres técnicos na área farmacêutica e do medicamento;
- Articulação com Serviços Farmacêuticos de outras entidades públicas ou privadas;
- Articulação com o DSP na elaboração de informações técnicas para aprovação dos serviços de turnos das farmácias e sobre cobertura farmacêutica.

3. ANÁLISE SWOT

3.1. PONTOS FORTES (S)

S) EQUIPA DE TRABALHO COESA E PROFISSIONAL

A equipa de trabalho da Farmácia Central da ARSC, I.P. conta com a presença de Farmacêuticos, Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica e Assistentes Operacionais que trabalham em conjunto num ambiente de cooperação.

Os Farmacêuticos são os profissionais que possuem os conhecimentos técnico-científicos que permitem que o medicamento correto seja concedido ao doente certo, sendo responsáveis pela coordenação e controlo de todo o circuito do Medicamento desde a sua aquisição, gestão e aprovisionamento, sendo que todos os colaboradores trabalham de forma empenhada com o mesmo objetivo: o de garantir a satisfação de pedidos nas UFs da área de abrangência da instituição e que se articulam com o GFM.

Durante o período de estágio senti-me integrado na equipa de trabalho, tendo executado diversas tarefas da responsabilidade do farmacêutico da área hospitalar, mais especificamente na área dos Cuidados de Saúde Primários (CSP).

S) ORGANIZAÇÃO DO ESPAÇO DE TRABALHO

A Farmácia Central organiza-se espacialmente em áreas distintas compreendendo os gabinetes farmacêuticos, uma sala reservada aos produtos inflamáveis, uma sala onde se armazenam os medicamentos e DM, uma sala para soluções injetáveis de grande volume, antissépticos e desinfetantes e uma sala de atendimento de vacinas que contém dez frigoríficos e duas câmaras de frio, uma para armazenamento do *stock* de produtos termolábeis e outra para armazenamento dos produtos termolábeis que seguem para distribuição nas respetivas rotas. Note-se que todas estas áreas estão devidamente sinalizadas, sendo que esta divisão consciente permite uma fácil organização e gestão de recursos humanos bem como uma ótima execução de tarefas por parte de todos os colaboradores.

S) SISTEMA DE GESTÃO INTEGRADA DO CIRCUITO DO MEDICAMENTO (SGICM)

O SGICM da *Glintt*, um programa incorporado no sistema informático da ARSC, I.P., possibilita um controlo de grande rigor nos processos de pedido e distribuição de todos os produtos, com especial relevância, os medicamentos e DM. Este *software* proporciona uma transparência em todo o circuito do medicamento, possibilitando uma ótima gestão de stocks no próprio armazém, bem como nas UFs com que este se articula, sendo esta última realizada, na grande maioria, por níveis de consumo mensal. A distribuição é então feita de acordo com as necessidades de cada uma das UFs, sendo estes níveis de consumo atualizados cuidadosamente pelos farmacêuticos do GFM em colaboração com os profissionais médicos e enfermeiros dos ACeS.

A natureza facilitante deste tipo de standartização traz, no entanto, alguns inconvenientes: um deles é o surgimento de *bugs* em alguns campos de preenchimento na interface do programa, bem como o tempo de espera por vezes ocorrido entre a realização de algumas tarefas; outro inconveniente é a dificuldade, por vezes notória, de alguns dos utilizadores do próprio sistema (pessoal responsável pelas requisições nas UFs), o que atrasa os processos de pedido ou que leva mesmo à ocorrência de erros no processo de requisição. Mesmo assim, pode-se dizer que o sistema traz um grande benefício na gestão organizacional e de distribuição efetuada pelos SF.

Esta metodologia de trabalho irá permitir, no futuro, transformar cada uma destas UF num “armazém integrado”, ou seja, será possível o acesso a toda a informação relativa às existências em cada uma das UF, facto que tornará ainda mais eficaz a gestão de existências.

S) PROTOCOLO DE SUBMISSÃO DE QUEBRAS NA REDE DE FRIO

A ARSC, I.P. é responsável pela correta receção, armazenamento e posterior distribuição de vacinas às várias UFs a que presta apoio, seguindo as normas orientadoras da DGS e do novo PNV, que sofreu algumas alterações no início do ano de 2017.

As vacinas armazenadas na Farmácia Central são distribuídas mensalmente pelos Serviços Farmacêuticos do GFM em caixas ou malas térmicas de forma a garantir a manutenção de temperatura adequada durante o seu transporte, mediante pedido de requisição prévia obrigatória em impresso ou pedido por parte das entidades interessadas. Estas são produtos termolábeis, devendo ser evitada a exposição solar e armazenadas entre 2-8 °C. O armazenamento das vacinas nas UF em frigoríficos deve ser monitorizado com um sistema de registo contínuo de temperatura e estes devem incluir uma ligação a uma fonte alternativa de energia elétrica, de modo a evitar a ocorrência de quebras na rede de frio. Caso se verifique uma quebra na rede de frio nas Ufs é necessário registar a temperatura no interior do frigorífico e todas as vacinas devem ser colocadas imediatamente num frigorífico alternativo, em quarentena. É obrigatório preencher um impresso de notificação de acidentes na rede de frio e enviar para o GFM com informações relativas ao local e duração da quebra, temperatura máxima atingida e ainda aos lotes, validades, quantidades e identificação das vacinas envolvidas. De seguida, os farmacêuticos no gabinete enviam para as entidades fornecedoras das vacinas um relatório de forma a avaliar a sua utilização ou inutilização mediante cada situação, aproveitando apenas as que garantam eficácia e segurança ao utente. Os principais objetivos são incentivar as Boas Práticas de Vacinação, garantindo a qualidade dos serviços de saúde, e prevenir os acidentes da rede de frio.

Durante o período de estágio, tive oportunidade de ajudar na distribuição das vacinas às respetivas Ufs e elaborei vários relatórios relativos a quebras na rede de frio. Estes foram posteriormente enviados às respetivas entidades fornecedoras das vacinas com o objetivo de receber um parecer sobre a possibilidade de utilização. Além disso, contactei diretamente com as Ufs lesadas de forma a obter mais informações sobre as causas propriamente ditas da quebra na rede de frio.

S) REQUISIÇÃO DE MEDICAMENTOS SUJEITOS A CONTROLO ESPECIAL (MSCE) E HEMODERIVADOS

Os estupefacientes e psicotrópicos, bem como os hemoderivados são medicamentos cuja distribuição é feita pedido a pedido e com um controlo diferente dos restantes produtos distribuídos pelo GFM da ARSC, I.P., controlo este assegurado pela manutenção de um número de registo interno.

No que diz respeito aos medicamentos estupefacientes e substâncias psicotrópicas foi possível lidar com seu o circuito, preparações e conhecer a legislação vigente que estabelece as regras relativas ao controlo do mercado lícito destas, ao abrigo da qual é feita a sua aquisição, requisição e dispensa pelo GFM. Fiquei a conhecer qual o tipo de requisição, dispensa, registo normalizado, arquivo e a compreender a obrigatoriedade e necessidade de realizar o preenchimento do Anexo X da Portaria n.º 981/98, de 8 de junho, como medida de controlo. Este procedimento necessita de um elevado rigor no seu cumprimento e uma responsabilidade acrescida por parte de cada um dos profissionais de saúde envolvidos neste circuito.

Os hemoderivados disponíveis nos SF, são as imunoglobulinas (Ig) anti-D/Rh e antitetânica e, pelo perigo de transmissão de doenças infecciosas, é fulcral a existência de um sistema de registos de consumo o mais completo e eficiente possível. O atendimento das Ig anti-D é então realizado pelas farmacêuticas de acordo com os pedidos realizados nas UF, sendo que o procedimento da Ig antitetânica é um pouco diferente, uma vez que os SF proporcionam a distribuição às UFs consoante o definido como necessário.

Como foi referido, para cada tipo de requisições (Anexo X e Hemoderivados) é fixado um número de registo interno, o que permite uma segurança extra na rastreabilidade no caso de uma situação de presumível transmissão de doença infecciosa.

Estão ainda definidos circuitos e horários otimizados para esta atividade, que envolve igualmente os medicamentos estupefacientes, psicotrópicos e hemoderivados, havendo dias fixos para a sua distribuição, sendo normalmente um motorista que vem recolher os pedidos da sua área geográfica e os distribui posteriormente nas UFs.

3.2. PONTOS FRACOS (W)

W) PERÍODO DE ESTÁGIO DE CURTA DURAÇÃO

Muito houve por conhecer acerca do trabalho desenvolvido pelo farmacêutico hospitalar, tanto no desempenho das funções internas à ARSC, I.P., como no contacto direto com os serviços desconcentrados. Apesar de todas as atividades desenvolvidas, penso que o tempo não foi suficiente para obter uma visão total das funções dirigidas ao farmacêutico.

Assim, foi difícil perceber completamente o modo de funcionamento das UF e de que forma o trabalho realizado no Gabinete de Coordenação e na Farmácia Central é recebido, na realidade, nessas unidades, por exemplo, quanto ao cumprimento de normas dos planos de promoção, prevenção e proteção da saúde, como é o caso do Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos (PPCIRA).

W) SISTEMA E CRITÉRIOS DE AQUISIÇÃO

Ao longo do período do estágio contactei de perto com o sistema de aquisição vigente, bem como os critérios de seleção e todo o enquadramento legal deste processo. O farmacêutico atua por definição dos cadernos de encargos com uma seleção que permite obter produtos com características técnico-científicas adequadas, o que comprova a importância do trabalho do farmacêutico como um profissional especializado no medicamento e que possui um papel ativo neste âmbito de intervenção.

No entanto, nos casos em que o processo de compra não seja por via de catálogo de compras públicas, o sistema de seleção é, por imperativa legal do secretário de estado, baseado no menor custo unitário dos medicamentos, dispositivos médicos e outros produtos de saúde necessários para responder às necessidades em saúde nas UF. Este fator limita o papel do farmacêutico neste processo, porque apesar de a contenção de custos ser necessária, muitas vezes um produto mais dispendioso poderá trazer vantagens ao nível de utilização na prática clínica e também criar um ganho, tanto a nível da qualidade dos cuidados de saúde como um ganho económico a longo prazo.

3.3. OPORTUNIDADES (O)

O) AQUISIÇÃO DE NOVOS CONHECIMENTOS ACERCA DE DISPOSITIVOS MÉDICOS (DM)

Durante estas 8 semanas, tive oportunidade de contactar com diversos recursos de grande utilidade e importância na prática clínica e que atualmente já possuem identificação no Formulário Nacional Hospitalar. Os profissionais que me acompanharam durante este período disponibilizaram-se para me mostrar os vários tipos de DM, tendo acompanhado a constante evolução técnica neste domínio, em especial o aparecimento constante de novos produtos desta área de designação. Esta oportunidade foi muito proveitosa, pois durante o meu percurso como estudante no MICF não tive muito contacto com este tipo de instrumentos de saúde tão utilizados nos CSP e, assim, pude adquirir conhecimentos de grande importância para o meu futuro como farmacêutico.

Tive também oportunidade de colaborar na elaboração de uma apresentação inserida no II Encontro do Grupo de Feridas do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG, E.P.E.) com o tema “Utilização de Bioactivos em Oncologia”, organizado pelo mesmo grupo em colaboração com o gabinete coordenador de formação.

A organização do evento emitiu um convite à Dr^a Catarina Coelho que prontamente se disponibilizou a participar com uma intervenção acerca da utilização de bioativos na área da oncologia em Portugal. Assim, foi-nos dada oportunidade, a mim e à minha colega de estágio, de realizar a pesquisa acerca do tema “Evidência científica no tratamento de feridas” explorado no evento, bem como a apresentação digital de forma a auxiliar o trabalho da Dr^a Catarina Coelho, ao mesmo tempo que alargamos os nossos conhecimentos nesta área.

O) APOIO À ACREDITAÇÃO DA USF DR. ARNALDO SAMPAIO

Uma das responsabilidades dos SF da ARSC, I.P. é apoiar o Departamento de Saúde Pública (DSP) nos programas de promoção, prevenção e proteção da saúde e, como já vimos, coordenar a atividade farmacêutica desenvolvida nos serviços desconcentrados.

Durante o período de estágio, surgiu a oportunidade de deslocação a uma das UF inseridas na zona de intervenção da ARSC, I.P., a Unidade de Saúde Familiar (USF) Santiago em Leiria. Esta unidade encontrava-se num processo de implementação de alterações funcionais e organizativas de forma a inserir-se nos padrões de qualidade nacionais definidos pela Estratégia Nacional para a Qualidade na Saúde. Este processo de certificação concede um grau superior de distinção na prestação de cuidados de saúde bem como um reconhecimento externo pela qualidade dos mesmos.

A atividade consistiu, numa primeira fase, numa reunião com o grupo clínico da unidade no sentido de conseguir uma otimização nos processos internos de utilização de recursos para que esta fosse de encontro às possibilidades de cedência pelos SF e que garantisse uma minimização de desperdícios, garantido assim uma melhoria na eficácia e sustentabilidade da prestação dos CSP. Seguiu-se um esclarecimento de dúvidas em relação à organização do espaço de armazenamento de medicamentos e DM, bem como a alteração da sua identificação pela Designação Comum Internacional (DCI), com associação ao respetivo Código Hospitalar Nacional do Medicamento (CHNM) tendo posteriormente participado nesta última atividade em conjunto com o grupo de trabalho que prontamente se disponibilizou.

Esta atividade permitiu-me entrar em contacto com o modo de funcionamento de uma USF, perceber as suas necessidades e o que implica um processo de acreditação para a Saúde. Foi também determinante para demonstrar a importância da presença física do farmacêutico nas UF.

O) PARTICIPAÇÃO EM REUNIÃO DO GRUPO PPCIRA

O Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos (PPCIRA) apresenta como principais estratégias a formação relativa ao controlo e prevenção de infeções e ao uso racional dos antibióticos.

As Administrações Regionais de Saúde, tal como a ARSC, I.P. possuem um grupo regional de PPCIRA que se articula com os grupos locais nos hospitais, UF prestadoras de CSP e UCCs da sua área de abrangência, tendo como objetivo geral “a redução das taxas de infeção associadas aos cuidados de saúde, hospitalares e da comunidade, assim como da taxa de microrganismos com resistência aos antimicrobianos”².

Tive oportunidade de estar presente numa reunião deste grupo coordenador, da qual fizeram parte alguns elementos dos grupos clínicos de várias UFs e onde se debateram principalmente as metas (constantes do plano operacional de controlo da infeção) a atingir por parte de cada uma delas. Os representantes do grupo clínico de cada uma das UF deram o seu parecer relativamente a estas, pela proximidade que têm com o utente, mostrando o que se poderia alterar no plano por forma a obter uma melhoria dos parâmetros avaliadores dos objetivos conseguidos.

Assim, esta experiência permitiu-me constatar o esforço realizado pelos profissionais que, num país que apresenta elevadas taxas de infeção associada aos cuidados de saúde, trabalham em união com o objetivo de melhorar os resultados apresentados regularmente.

O) DESENVOLVIMENTO DE MATERIAL DE INFORMAÇÃO

Foi proposta a criação de um rótulo informativo relativo ao modo de preparação e utilização de um desinfetante de superfícies, sob a forma de pastilhas efervescentes, recentemente adquirido pelo GFM, a ser utilizado futuramente nas UFs. Assim, em conjunto com a minha colega de estágio, Inês Cruz, foi escolhido o conteúdo técnico-científico a colocar num rótulo destinado às embalagens do produto recém preparado. Nesse rótulo consta a designação do produto em questão, Ipoclor[®], e o seu modo de preparação e utilização. O objetivo desta atividade foi o de assegurar a correta identificação, bem como a sua preparação e utilização, tornando estes processos mais práticos para os responsáveis pela desinfecção das UFs.

3.4. AMEAÇAS (T)

T) DIFÍCIL ACESSO DOS FARMACÊUTICOS À ÁREA DOS CSP

Foi perceptível desde o início do estágio que, muitas vezes, alguns problemas seriam facilmente resolvidos se existisse um farmacêutico nas UFs de forma permanente. O farmacêutico daria certamente um importante contributo ao funcionamento das unidades prestadoras de CSP, ao haver a possibilidade de introdução do conceito de Cuidados Farmacêuticos nas mesmas.

Serviços como a gestão do aprovisionamento, acompanhamento do consumo de medicamentos com revisão farmacoterapêutica, bem como um serviço de farmacovigilância, trariam enormes vantagens aos utentes de UFs de grande abrangência populacional no que diz respeito aos resultados em saúde, ao incluir o farmacêutico como um elemento de intervenção no uso racional, eficaz e seguro de medicamentos, ao mesmo tempo que se agilizaria o funcionamento dessas UFs.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Depois de concluir este estágio sinto que consegui alargar a visão acerca da esfera de ação do farmacêutico por me ter sido dada a oportunidade de desenvolver um exercício profissional do âmbito hospitalar ligado aos Cuidados de Saúde Primários.

O trabalho realizado no Gabinete de Farmácia e Medicamento da ARSC, I.P. permitiu-me colocar muitos dos conhecimentos teóricos obtidos ao longo do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas num ambiente real de exercício profissional, numa área de difícil entrada para o profissional farmacêutico.

**PARTE II – RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA
COMUNITÁRIA**

I. NOTAS INTRODUTÓRIAS

Na reta final de todos estes anos de aprendizagem, os estudantes são postos à prova em ambiente real de exercício da profissão farmacêutica, naquele que é o seu lugar por excelência: a Farmácia Comunitária (FC). É deste modo que nos preparamos para um futuro enquanto farmacêuticos, adquirindo uma visão ativa de como é o dia-a-dia de contacto com o utente e o que é exigido para a execução das diversas tarefas que visam o adequado funcionamento de uma FC.

O presente relatório apresenta uma reflexão crítica da atividade realizada como estagiário em FC no âmbito da unidade curricular “Estágio Curricular” constante no plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF). Este estágio apresentou-se como a primeira oportunidade de contacto direto com o trabalho realizado numa FC em todas as suas vertentes, desde as tarefas de *backoffice* até ao aconselhamento farmacoterapêutico.

Assim, durante um período de 4 meses decorrido entre março e junho de 2018, integrei a equipa de trabalho da Farmácia Sitália em Coimbra, tendo tido a oportunidade de, junto de profissionais experientes, adquirir novas competências e vivenciar diferentes situações frequentes na prática da FC, sob orientação da Dra. Susana Sousa. Este momento na minha formação constituiu então, uma forma de reconciliação dos conhecimentos teóricos apreendidos ao longo dos últimos anos com efeito prático na diversidade de serviços prestados pela Farmácia Sitália, bem como ao nível organizacional e de gestão de recursos em FC; além disto foi-me permitido constatar o carácter social inerente à profissão bem como a importância da comunicação com o utente para um ganho de saúde da comunidade que usufrui dos serviços exclusivos da Farmácia.

O presente relatório é também apresentado sob a forma de uma análise SWOT, expondo, ao nível interno, os pontos fortes (*Strengths*) e os pontos fracos (*Weaknesses*), e ao nível externo, as oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*) relativos à minha experiência em FC e ao método de trabalho implementado na Farmácia Sitália. Cada tópico constante nesta análise está devidamente identificado pelas iniciais S, W, O e T, referentes ao acrónimo SWOT.

2. ANÁLISE SWOT

2.1. PONTOS FORTES (S)

S) EQUIPA DE TRABALHO EXPERIENTE E PROFISSIONAL

A Farmácia Sitália conta com uma equipa de profissionais com elevada experiência, o que faz com que esta seja vista pelos utentes como um local de referência na prestação de serviços farmacêuticos. Apresentando-se como uma farmácia de pequena dimensão, a equipa de trabalho é composta por 4 elementos: Dr. João Reis (Direção Técnica), Dra. Susana Sousa (Farmacêutica Substituta), Dra. Carla Branco (Farmacêutica) e Célia Simões (Administrativa).

S) INTEGRAÇÃO DO ESTAGIÁRIO

Desde o primeiro dia de estágio, todos os elementos integrantes da equipa de trabalho demonstraram uma enorme disponibilidade para me transmitir novas noções e conhecimentos, tendo-me dado autonomia para a execução das tarefas que realizei na farmácia.

Ao longo do tempo e de acordo com a minha evolução, fui exercendo diferentes funções da responsabilidade do farmacêutico numa FC segundo as diretrizes da Ordem dos Farmacêuticos (OF) relativas às Boas Práticas Farmacêuticas para a FC e sob orientação dos farmacêuticos que me acompanharam. O acompanhamento ao estagiário consistiu então numa assistência às funções exercidas, desde a receção de encomendas, passando pela organização do espaço de armazenamento de acordo com o estabelecido pela Direção Técnica, realização de pedidos às distribuidoras, até ao atendimento com aconselhamento farmacoterapêutico e com recurso às prescrições electrónicas sem papel ou a prescrições manuais, agora menos recorrentes. Além disso, desde o primeiro dia de estágio, pude contactar com a utilização dos dispositivos de medição da pressão arterial e da glicémia, para além de ter assistido a muitos casos de utentes que se faziam acompanhar de análises clínicas em busca de uma opinião de um profissional de saúde.

Desde cedo fui colocado em contacto com o atendimento realizado pelos farmacêuticos acima mencionados, tendo este facto constituído um reforço na assimilação dos conhecimentos adquiridos ao longo do mestrado, mas acima de tudo, uma aprendizagem no que diz respeito, particularmente, a medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) e outros produtos de saúde como os suplementos alimentares, produtos de dermofarmácia e cosmética, de higiene buco-dentária e produtos capilares. Tive também a

oportunidade de constatar a importância da faceta comunicacional da profissão, passando umas semanas mais tarde a realizar atendimento de forma autónoma, sob supervisão dos farmacêuticos da equipa.

S) ORGANIZAÇÃO DA FARMÁCIA

O início do período do estágio foi marcado pelo reconhecimento da organização espacial da farmácia. A Farmácia Sitália conta com um espaço de atendimento ao público, uma zona reservada ao armazenamento de medicamentos e outros produtos de saúde e um gabinete do utente.

Assim, no espaço de atendimento ao público encontram-se os MNSRM de IVA a 6%, localizados atrás do balcão e inacessíveis ao utente; também neste espaço se encontram os produtos de dermofarmácia e cosmética, suplementos alimentares e outros produtos de venda livre (IVA a 23%), estando organizados, na generalidade, por patologia. Encontramos então várias secções devidamente delimitadas, destinadas à exposição de, por exemplo, medicamentos e outros produtos indicados no alívio de sintomas de gripes e constipações, alergias, problemas gastrointestinais, problemas de ossos e articulações, problemas capilares, entre outros; no caso dos produtos de dermofarmácia e cosmética, os mesmos estão expostos por marca e indicação.

Na sala de armazenamento encontramos os medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) dispostos por forma farmacêutica e por ordem alfabética. Existem então armários dedicados ao armazenamento de comprimidos e cápsulas, supositórios, colírios e pomadas oftálmicas, formulações de uso auricular, xaropes e suspensões orais, cremes e geles de uso tópico, pós e granulados para suspensão ou solução oral e ampolas bebíveis, injetáveis, sistemas transdérmicos, bem como uma zona exclusiva para os dispositivos utilizados na asma e na DPOC e outra para os produtos integrados no Programa de Prevenção e Controlo da Diabetes da Direção-Geral da Saúde (DGS). Os anticoncecionais possuem também um armário exclusivo e os medicamentos psicotrópicos e estupefacientes encontram-se numa gaveta própria. Este espaço conta também com um frigorífico reservado aos medicamentos e outros dispositivos que possuem condições especiais de armazenamento (entre 2 a 8°C) e uma zona reservada a armazenamento de *stock* extra. É ainda nesta área que é efetuada a receção de encomendas e o processo de gestão de devoluções, com recurso ao sistema informático 4DigitalCare.

S) SISTEMA INFORMÁTICO 4DIGITALCARE

A Farmácia Sitália tem a sua gestão informática assegurada pelo *software* 4DigitalCare e não pelo SIFARMA 2000®, como na generalidade das farmácias portuguesas.

Esta aplicação constitui um sistema de informação para a saúde que permite a execução de todas as tarefas necessárias a uma adequada gestão de um espaço de venda de medicamentos e outros produtos de saúde, tais como efetuar a receção de encomendas, a gestão de devoluções, consulta de disponibilidade de produtos nas diversas distribuidoras, gestão de existências na farmácia, criação e atualização de fichas de cliente, consulta de folhetos informativos e resumo das características dos medicamentos (RCM), bem como a própria venda de MNSRM ou outros produtos de venda livre e ainda de MSRM por consulta dos dados constantes nas receitas electrónicas sem papel (designação por DCI, indicação médica e planos de comparticipação).

Assim é garantida uma eficaz e prática gestão de recursos do ponto de vista farmacoeconómico e, acima de tudo, uma minimização de erros na cedência o que se traduz num ganho a todos os níveis para os utentes que escolhem a FS para satisfazer as suas necessidades em saúde.

S) SERVIÇO DE CONFERÊNCIA DO RECEITUÁRIO

Todos os meses, na Farmácia Sitália, as prescrições manuais validadas pelo farmacêutico responsável pela venda passam por um processo de conferência antes de se dirigirem para o Centro de Conferência de Faturas (CCF) do Serviço Nacional de Saúde (SNS), o organismo responsável pela “gestão de todas as atividades relacionadas com o processamento de conferencia de faturas”³. Desta forma, garante-se a minimização de erros relacionados com os documentos de prescrição e o “correto apuramento de contas entre o SNS e o serviço prestador”³, neste caso, a Farmácia.

S) CLIENTES FIDELIZADOS

Durante o período de estágio, foi fácil perceber que eram muitos os utentes que se dirigiam regularmente à Farmácia Sitália e que contavam com os profissionais acima referidos em busca de um aconselhamento profissional, experiente e de confiança. Assim, muitas vezes, os utentes mostravam preferência em ser atendidos pelos farmacêuticos que já conheciam e em que confiavam, o que me impedia de praticar o aconselhamento, ficando-me apenas pela observação do mesmo. No entanto, este facto, trouxe-me a oportunidade de ter a percepção

de muitas das histórias clínicas destes utentes, acompanhando os processos de revisão de terapêutica após consulta médica e os resultados conseguidos com a ajuda do farmacêutico, oferecendo-me até a oportunidade de analisar dados constantes em análises clínicas.

S) EXISTÊNCIA DE TESTERS DE DISPOSITIVOS MÉDICOS

Quando se fala de dispositivos médicos destinados a ser usados pelo utente para uma eficaz ação terapêutica, é necessária a prestação de todas as instruções relativas à sua correta utilização e aos cuidados no seu manuseamento e conservação. Na Farmácia Sitália, estavam disponíveis a grande maioria dos dispositivos disponíveis no mercado em versão de *tester*, no que diz respeito a inaladores e nebulizadores, produtos estes que normalmente vêm selados desde o seu local de produção. Este facto permitiu-me fazer uma revisão acerca do funcionamento deste tipo de dispositivos, fomentando a minha capacidade de auxiliar os utentes a realizar estas terapêuticas.

S) VALORMED – GESTÃO DE RESÍDUOS DE EMBALAGENS E MEDICAMENTOS FORA DE USO

A Valormed é uma sociedade sem fins lucrativos que tem como responsabilidade a gestão de resíduos medicamentosos e que surge da necessidade da existência de um sistema autónomo da sua recolha e tratamento e que permita a sua segregação dos restantes resíduos urbanos. A colaboração dos utentes da Farmácia para com este serviço foi algo que me trouxe alguma surpresa, sendo que, muitas vezes, as pessoas deslocavam-se a este espaço com a única finalidade de fazer esta “reciclagem” especializada tão importante para o circuito do medicamento e para a proteção do ambiente.

2.2. PONTOS FRACOS (W)

W) REDUZIDO NÚMERO DE EXISTÊNCIAS

A aquisição de produtos é realizada nesta Farmácia com recurso a diferentes vias, sendo que na generalidade das situações, os pedidos são feitos por utilização do *software* da MAGIUM, uma plataforma de comunicação entre as FC e as Indústrias Farmacêuticas que permite a aquisição de uma elevada abrangência de produtos com garantia de um curto prazo de entrega. No caso da Farmácia Sitália, os pedidos feitos até às 12h30 são entregues

até as 16h30 e os pedidos feitos até às 19h30 são entregues na manhã seguinte; as encomendas de quantidades mais significativas e outros pedidos são feitos diretamente às distribuidoras, nomeadamente à Empifarma, Plural ou Alliance HealthCare; no caso dos medicamentos cuja distribuição é sujeita a notificação prévia do INFARMED, I.P., o pedido é feito pela Via Verde do Medicamento aos distribuidores aderentes, mediante apresentação de uma prescrição válida.

O presente volume de vendas desta Farmácia gera uma necessidade de gestão eficiente na minimização de stock morto por parte da direção técnica, o que não permite uma grande quantidade de existências disponível. Ora, este facto traz a desvantagem de, algumas vezes, os utentes não conseguirem adquirir tudo o que necessitam no momento, o que pode constituir um desincentivo à fidelização de novos clientes.

W) REDUZIDA VISIBILIDADE E LUGARES DE ESTACIONAMENTO INSUFICIENTES

A Farmácia Sitália, apesar de uma excelente localização, não possui as melhores condições de visibilidade da sua fachada. O logótipo localizado acima da mesma não oferece uma grande visibilidade, o que, aliado à inexistência do símbolo “cruz verde”, que normalmente se deve encontrar “iluminado durante todo o período de abertura da farmácia, incluindo quando a farmácia estiver de turno”⁴, constituem dois fatores que tornam difícil, para os transeuntes, a identificação deste espaço. A juntar a estes dois fatores, a ausência de lugares de estacionamento exclusivos a utentes da farmácia numa zona de tráfego intenso, reduz a possibilidade de atração de novos utentes a este profícuo espaço de saúde pública.

W) PREPARAÇÃO DE MEDICAMENTOS MANIPULADOS

No panorama atual, a grande maioria de medicamentos manipulados (MM) requisitados em FC destinam-se à dermatologia e pediatria.

Durante o período de estágio nesta Farmácia, poucas foram as oportunidades de preparação de manipulados, sendo que o único contacto estabelecido com este serviço consistiu na observação do trabalho do Dr. João Reis e da Dra. Susana Sousa, os principais responsáveis pela preparação destes. O processo começava pela elaboração de uma ficha de preparação do MM nos casos em que era necessária a realização de cálculos, seguida de desinfecção da bancada de trabalho e dos materiais que contactam com as matérias primas, preparação do MM e criação do rótulo no qual constavam instruções relativas à conservação e a validade do medicamento.

Assim, no período em que estagiei neste espaço, as oportunidades não foram suficientes para colocar em prática muitos dos conhecimentos adquiridos na unidade curricular de Farmácia Galénica.

W) PRIMEIRO CONTACTO COM O UTENTE

Quando somos confrontados com a prática do aconselhamento em FC, existem outras exigências requeridas ao profissional e que, a meu ver, são de importância comparável às próprias competências científicas. O Farmacêutico, para além dos conhecimentos ao nível da farmacologia e farmacoterapia que deve possuir para realizar um correto aconselhamento, tem que comunicar da forma mais eficaz de modo a entender as reais necessidades do utente e, assim, conseguir satisfazê-las e, conseqüentemente, ganhar a sua confiança. O ato farmacêutico adquire, assim, um carácter comunicacional que vai sendo construído com base na experiência profissional e com as diversas situações possíveis de vivenciar num local de tanta proximidade com o utente como a FC.

O estágio realizado na Farmácia Sitália constituiu a minha primeira oportunidade de contacto direto com o utente, o que foi de facto muito intimidante nos primeiros tempos e que trouxe algum nervosismo que, no início, se assumiu como uma barreira no desempenho ótimo na prestação de informação adequada à resolução dos seus problemas. No entanto, com o passar do tempo, e com a ajuda da equipa que me acompanhou ao longo destes 4 meses, senti que fui sendo cada vez mais desenvolvido e capaz no desempenho destas funções.

2.3. OPORTUNIDADES (O)

O) LOCALIZAÇÃO E HORÁRIO DE FUNCIONAMENTO DA FARMÁCIA

Esta Farmácia localiza-se numa zona da cidade com elevada densidade habitacional com moradores de diferentes faixas etárias, estando próxima de várias instituições de ensino e das instalações da Portugal Telecom, empresa que compreende centenas de funcionários. Encontra-se aberta ao público de segunda a sexta-feira, das 9h às 19h30 e aos sábados, das 9h às 13h, contando com um serviço permanente (24h) a cada 20 dias. Estes dois factores permitem a receção de um vasto número de utentes com diferentes necessidades, tornando a Farmácia Sitália, um local de passagem para uma quantidade significativa de pessoas.

O) CONTACTO COM OUTROS PRODUTOS DE SAÚDE

O longo percurso percorrido até ao último semestre do MICF, no qual contactamos com a prática de aconselhamento farmacoterapêutico, prende-se com a aquisição massiva de conhecimentos relativos às múltiplas dimensões do medicamento e tudo aquilo que o envolve. No entanto, numa FC podemos encontrar uma grande variedade de produtos com os quais não lidamos tão frequentemente no decorrer do mestrado, principalmente no caso da suplementação alimentar, da dermofarmácia e cosmética, cuidados capilares e higiene buco-dentária. Estas são áreas marcadas por um aparecimento constante de novos produtos, o que exige uma constante atualização de conhecimentos que também se torna necessária pela grande fatia da faturação que constituem no âmbito de mercado de uma FC.

A possibilidade de assistir ao processo de atendimento desde o início do estágio permitiu-me, então, com o auxílio de toda a equipa de farmacêuticos da Farmácia Sitália, um melhor entendimento das características e indicações destes produtos.

O) ACESSO A FORMAÇÕES

Durante o período de estágio, tive oportunidade de assistir a uma formação de dermofarmácia e cosmética providenciada pela marca Isdin. Ao longo de 1h30 foram enunciadas as diferentes gamas de produtos direcionados ao cuidado da pele, saúde bucodentária e das unhas, e com mais destaque - pela época do ano em que nos encontrávamos - a gama de fotoproteção oferecidas pela marca. Foram abordadas as indicações referentes aos diferentes produtos, tendo sido distribuído material de leitura pelos formandos. Também a Bioderma disponibiliza uma aplicação para dispositivos móveis destinada aos profissionais de FC que se baseia num questionário acerca das características e indicações dos seus diferentes produtos.

Este tipo de atividades promovidas pelas marcas são extremamente vantajosas não só para as mesmas, como forma de promoção, mas também para os profissionais de FC que nelas encontram uma forma de atualização dos conhecimentos necessários para a prática de um aconselhamento mais informado, ao mesmo tempo que adquirem Créditos de Desenvolvimento Profissional (CDP), necessários à Revalidação da Carteira Profissional emitida pela Ordem dos Farmacêuticos (OF).

Além destas, tive oportunidade de estar presente numa formação de Segurança, Higiene e Saúde no Trabalho, também conducente à obtenção de CDP para os profissionais registados na OF.

2.4. AMEAÇAS (T)

T) VENDA LIVRE DE MNSRM

Os MNSRM são medicamentos que são utilizados há muitos anos no tratamento de problemas de saúde de baixa gravidade e que possuem um perfil de eficácia e segurança bem conhecido.

Assim, para além do facto de poderem ser vendidos sem prévia prescrição, os MNSRM podem ser escolhidos livremente pelo utente, sendo que, no nosso país, são encontrados em diversos postos de venda que não a farmácia. Temos como exemplo, locais como hipermercados, nos quais os preços praticados geralmente são mais convidativos do que os praticados na FC. Este é um fator que coloca em risco a sustentabilidade das FC e da própria profissão, e traz ainda outro tipo de preocupações para a saúde pública. O facto de podermos encontrar os MNSRM em locais aonde os utentes se deslocam com elevada frequência para fazerem outro tipo de compras, contribui para a banalização do valor em saúde dos MNSRM, que nunca devem ser equiparados a outros produtos de utilização comum. Torna-se também mais fácil a prática da automedicação, com todas as desvantagens anexas, surgindo uma preocupação crescente com a saúde dos utentes que, nesses locais de venda, não recebem as informações necessárias à sua utilização.

T) INFORMAÇÃO ACESSÍVEL AO UTENTE E A CREDIBILIZAÇÃO DO FARMACÊUTICO

Hoje em dia, muitos são os casos em que os utentes se deslocam à farmácia com uma ideia pré-formada acerca dos medicamentos, colocando em causa a adesão à terapêutica, ou até sobre o modo como estes devem ser tomados. Isto acontece pela facilidade de acesso a informação sobre saúde, quer por via da internet, quer por outros meios de comunicação que muitas das vezes não constituem uma forma de obtenção de informação fidedigna. Outras vezes, essas informações são transmitidas por pessoas próximas do utente sem qualquer tipo de base científica.

Assim, o farmacêutico é colocado em situações em que se torna necessário reeducar os utentes para a correta utilização dos medicamentos ou explicar a indicação a que esses se destinam, o que, muitas das vezes, constitui um entrave à relação farmacêutico-utente, criando raízes de descrença neste profissional de tão importante relevo para a saúde da comunidade.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a conclusão deste estágio, posso dizer que tive uma experiência extremamente fiel ao panorama atual de prestação de serviços e cuidados de saúde concernente à área de Farmácia Comunitária.

Durante o período de estágio tive a oportunidade de experienciar todo o trabalho envolvido na manutenção do bom funcionamento de uma FC, tendo realizado a grande maioria das funções para isso requeridas e vivenciado um variado número de situações em que pude assistir ao trabalho dos farmacêuticos de elevada experiência e profissionalismo que me acolheram no seu espaço de trabalho.

Dando o melhor contributo possível para a minha formação pessoal, os colaboradores da Farmácia Sitália acompanharam os meus primeiros passos como profissional de Farmácia Comunitária, uma área que até à data não se revelava de grande interesse para mim e que, agora cresceu na minha consideração. É, de facto, notória a importância da existência de espaços como as FC, que funcionam como elos de ligação entre os utentes e profissionais de saúde de competência capital ao nível do medicamento e que se mostram versáteis nas possíveis abordagens às mais desafiantes situações que podem surgir num espaço público de tamanha relevância. Assim, o farmacêutico da área da FC apresenta-se como um elemento fundamental na educação e promoção para a saúde.

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Coimbra, curso de referência da profissão farmacêutica, apresenta-se então, como uma base de suporte essencial ao seu exercício.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS – PARTE I E II

- 1 – CONSELHO DIRETIVO DA ADMINISTRAÇÃO REGIONAL DE SAÚDE DO CENTRO, I.P. – Regulamento interno da Administração Regional de Saúde do Centro, I.P. Coimbra, 2013. [acedido a 28 de julho de 2018]. Disponível na Internet: http://www.arscentro.min-saude.pt/Institucional/Documents/Reg_Interno_ARSC_2013%20DR.pdf
- 2 – DIREÇÃO-GERAL DE SAÚDE – Despacho de criação de Grupos Coordenadores Regionais de Comissões de Controlo de Infeção. Lisboa, 2013 [acedido a 28 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <http://dre.pt/pdf2sdip/2013/02/038000000/0717907180.pdf>
- 3 – SERVIÇO NACIONAL DE SAÚDE – Centro de Conferência de Faturas – Apresentação [acedido a 1 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.ccf.min-saude.pt/portal/page/portal/publico/InformacaoInstitucional>
- 4 – ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – Norma geral sobre as infraestruturas e equipamentos - Boas práticas de Farmácia Comunitária [acedido a 10 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/norma_geral_sobre_as_infraestruturas_e_equipamentos_20240917255ab147e12498f.pdf

**PARTE III – MONOGRAFIA INTITULADA “H4R COMO UM
NOVO ALVO NA TERAPIA ANTICARCINOGÉNICA”**

I. INTRODUÇÃO

Nos dias de hoje o cancro é a segunda causa de morte a nível global, tendo sido responsável por 8.8 milhões de mortes em 2015.¹

A investigação científica na área da oncologia procura soluções para o combate ao desenvolvimento e progressão dos vários tipos de carcinoma, procurando o entendimento da doença a nível molecular. Falamos de uma doença de origem multifatorial e cuja terapia depende do tipo de cancro e do seu estado evolutivo sendo que, na maioria dos casos, esta é feita com recurso a mais do que um tipo de tratamento. Assim, atualmente, recorre-se à cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, terapia hormonal, ao transplante de células estaminais ou a novas formas de terapia localizada.²

Grupos de investigadores em todo o mundo têm vindo a trabalhar na descoberta de novas formas de terapia localizada mais eficazes e menos agressivas para o paciente do que a quimioterapia regular que, como sabemos, leva a um ataque celular indiferenciado, atuando os fármacos tanto nas células mitóticas normais, como nas malignas, estando comprometida a eficácia e segurança do tratamento, bem como a qualidade de vida do paciente. Coloca-se então como meta atual a pesquisa de novos alvos terapêuticos e o estudo da influência de diferentes ligandos na alteração de vias biológicas que se relacionam com a génese e o desenvolvimento de vários tipos de cancro.³

É neste âmbito que surge a escolha deste tema. A crescente evidência de que a histamina endógena tem um papel ativo na proliferação celular, no mecanismo de apoptose e angiogénese,⁴ tendo sido a 26escarboxilase da L-histidina (HDC) encontrada em análises de tecidos e linhas celulares malignas⁵, leva-nos a supor uma possível relação entre a atividade biológica desta molécula e do estado conformacional dos seus receptores com o aumento da proliferação celular associado a um aumento de volume de tecido tumoral indiferenciado, suportando a hipótese da atuação da histamina como um fator de crescimento.⁴ Tudo isto abriu caminho à comunidade científica que tem vindo a procurar novas abordagens na terapia anticarcinogénica.

2. A HISTAMINA E OS SEUS RECETORES

A histamina, $C_5H_9N_3$, é uma molécula multifuncional de origem biológica, produto da descarboxilação da histidina, um aminoácido essencial.

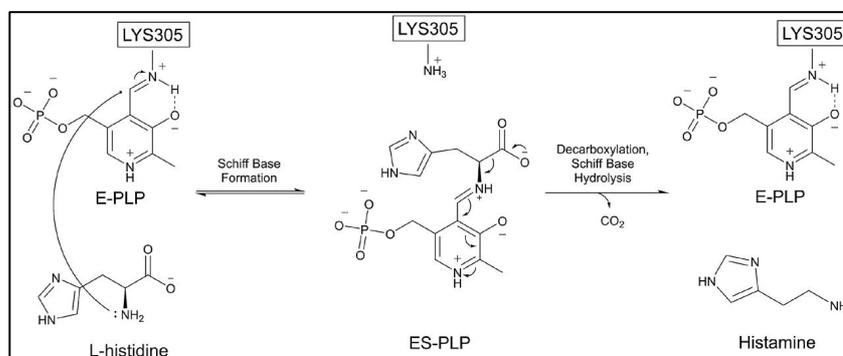


Fig.1: Mecanismo de descarboxilação da L-histidina pela HDC, usando o PLP como cofator. Adaptado de [6]

A sua síntese ocorre em diferentes células humanas, principalmente no interior dos mastócitos e basófilos, passando depois a ser armazenada em grânulos ou vesículas, ou inativada pela N-metiltransferase da histamina ou pela diamina oxidase. Esta amina biogénica encontra-se envolvida em diferentes processos fisiológicos e patofisiológicos, nomeadamente conjuntivite, rinite alérgica, urticária, dermatite atópica, asma, anafilaxia, broncoconstrição, vasodilatação, secreção de muco, secreção de ácido gástrico, atuando também como um neurotransmissor de ação central.⁷ Os seus efeitos advêm da interação com os recetores que se apresentam sob a forma de 4 diferentes subtipos: recetor da histamina H_1 (H_1R), H_2R , H_3R e H_4R , sendo todos eles pertencentes à família dos recetores acoplados à proteína G (GPCRs).

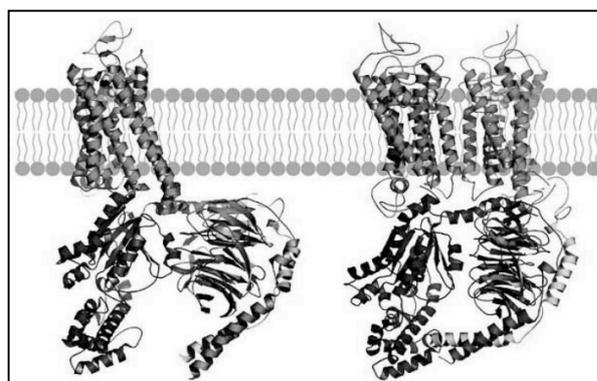


Fig.2: Modelo computacional de recetores acoplados a proteína G (GPCRs) baseado na estrutura cristalina da rodopsina. Adaptado de [8]

Estes diferentes subtipos de receptor diferem na sua distribuição, afinidade a diferentes ligandos, vias de sinalização e funções.⁹

Desde o início do século XX, com a descoberta da atividade biológica da histamina, a caracterização funcional dos seus recetores tem sido intensamente estudada, no entanto, ainda hoje não é conhecida toda a sua envolvimento em diferentes mecanismos fisiopatológicos.

Na terapia farmacológica atual, com várias moléculas lançadas no mercado, encontramos o grupo dos “anti-histamínicos” H₁. Estas moléculas com afinidade para os H₁R são utilizadas no alívio de sintomas em reações de hipersensibilidade com um alto nível de eficácia e segurança, o que levou ao aparecimento de um grande número de princípios ativos no mercado, cada vez com menos efeitos secundários. Temos como exemplos a rupatadina, desloratadina e a levocetirizina, que apresentam uma elevada afinidade para os H₁R periféricos e uma penetração diminuta no Sistema Nervoso Central, consequência de uma fraca penetração na barreira hematoencefálica. Ao nível dos recetores H₂R, a cimetidina e a ranitidina apareceram como moléculas utilizadas no tratamento de úlceras gástricas e duodenais e no refluxo gástrico, tendo no entanto perdido destaque pelo aparecimento da classe dos inibidores da bomba de prótons (i.e: omeprazol, pantoprazol), fármacos que apresentam menos efeitos secundários para a mesma indicação.¹⁰

3. A HISTAMINA E A PROLIFERAÇÃO CELULAR

Os efeitos da histamina e de outros mediadores provenientes dos mastócitos na proliferação celular têm sido estudados por vários grupos de investigadores, sendo que a primeira proposta de relação entre a histamina e tumores malignos surge em 1968, num estudo realizado por Khalson & Rosegreen.⁵

Evidências de uma concentração superior de histamina em tumores como o melanoma, do cólon e da mama e a ocorrência da descarboxilase da L-histidina (HDC) em grande parte das linhas celulares malignas, encontram-se reportadas em numerosos estudos,⁵ sendo que a presença de mastócitos em tecidos cancerígenos é também uma realidade conhecida e explorada em diferentes pesquisas relacionadas principalmente com o cancro do pulmão.¹¹

Um estudo realizado por Bartholeyns & Bouclier¹² em 1984, relaciona a inibição da enzima responsável pela síntese da histamina (HDC) pela monofluorometilhistidina com efeitos anti-tumorais em roedores.

Também a presença dos receptores H₄ da histamina em numerosos tecidos tumorais está reportada em diversos estudos⁵ como poderá ser observado em maior detalhe no ponto 4 da presente monografia.

Assim, a hipótese da envolvimento da histamina, dos seus diferentes receptores e da HDC em processos relacionados com a carcinogénese começou a ganhar relevância no panorama da investigação científica, sendo que logo no ano de 2000, num estudo de Rivera e outros colaboradores, denominado “Histamine as an autocrine growth factor: an unusual role for a widespread mediator”¹³, são relacionadas as concentrações de histamina, de HDC e os diferentes subtipos de receptor em roedores, com respostas celulares como a proliferação, migração, diferenciação e o potencial apoptótico. O artigo publicado explora também a propriedade angiogénica da histamina pela sua capacidade de promover a síntese do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), impulsionando assim o aparecimento de metástases.

4. EFEITO DE LIGANDOS DOS H4R EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE CANCRO

A complexidade dos processos de desenvolvimento e progressão do cancro leva à necessidade da compreensão do seu microambiente, intervenientes celulares e moleculares, bem como as suas interações.¹¹

A evidência da expressão de H4R em diferentes tipos de tumores suscitou interesse na avaliação do efeito de diferentes ligandos em alguns modelos experimentais. Assim sendo, este capítulo consistirá na análise de dois estudos e os métodos neles empregues, com elucidação das conclusões relativas ao efeito de ligandos dos H4R em modelos patológicos experimentais de dois tipos de cancro (cancro da mama e melanoma humanos) e à influência de diferentes mediadores biológicos no desenvolvimento e progressão do cancro.

4.1. CANCRO DA MAMA

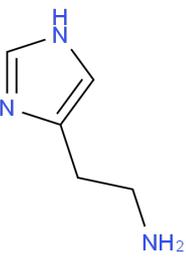
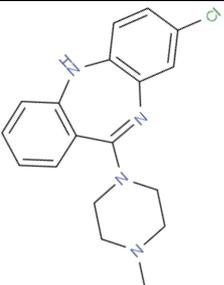
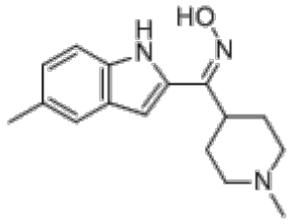
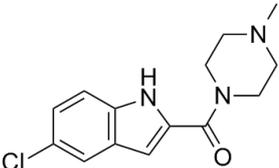
O cancro da mama é a mais comum doença neoplásica na mulher, sendo diagnosticado em 1.5 milhões de mulheres todos os anos e causando o maior número de mortes relacionadas com cancro nas mulheres. Em 2015, 570.000 mulheres morreram com cancro da mama.¹⁴

Num estudo publicado em 2012, com o título “Therapeutic potential of histamine H4 receptor agonists in triple-negative human breast cancer experimental model”¹⁵, um grupo de investigação avaliou os efeitos de ligandos dos H4R na taxa de crescimento tumoral,

capacidade metastática e potencial apoptótico num modelo patológico experimental de cancro da mama humano, com realização de ensaios *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*. O tipo de tumor estudado trata-se de um tumor “triplo-negativo”, isto é, um tumor deficiente em recetores de estrogénio, recetores de progesterona e em factores de crescimento epidermal, o que faz com que seja um tipo de tumor com um prognóstico muito desfavorável e cujo *targeting* se torna, por estas características, muito difícil.

Para a execução deste estudo, foi utilizada uma linha celular de cancro da mama “triplo negativo” designada por MDA-MB-231 e diversos ligandos dos H4R. A linha celular foi colocada num meio de cultura favorável ao seu crescimento para posterior utilização nos ensaios. Foram utilizadas várias moléculas como ligandos dos H4R, incluindo agonistas e antagonistas, pois com dados referentes à utilização de apenas um ligando, seria muito difícil compreender completamente os mecanismos fisiológicos deste receptor quando sujeito a diferentes condições, em diferentes espécies e tipos celulares.

Tabela I: Moléculas utilizadas nos ensaios. Imagens adaptadas de ^[16,17]

Histamina	Clozapina	JNJ28610244	JNJ777120
			
Molécula biológica, agonista de alta afinidade não seletiva para os H4R, apresentando reatividade cruzada com todos os subtipos de receptores.	Antipsicótico atípico, agonista de alta afinidade e seletividade para os H4R; aprovado para uso em humanos.	Agonista de alta potência, afinidade e seletividade para os H4R.	Antagonista de referência, com menos afinidade do que a histamina, utilizado para avaliar a atividade da clozapina como agonista.

Foram então realizados vários ensaios *in vitro* de modo a concluir acerca da proliferação celular e determinação do potencial apoptótico:

Para estudar a proliferação celular nesta linha celular, foi realizado um ensaio clonogénico da linha celular supracitada. As células foram transferidas para placas de cultura de 12 poços, havendo um grupo de células não tratadas (controlo) e grupos de células tratadas com soluções de histamina, clozapina e JNJ28610244 em concentrações de 0,01 até

50 μM e/ou JNJ777120 com concentração de 10 μM . Posteriormente procedeu-se à incubação durante 7 dias e, após esse período, à fixação com formaldeído em solução tampão fosfato-salino (PBS), realizando-se uma coloração com azul de toluidina a 1% p/v em etanol a 70% v/v. Foram consideradas como resultados positivos para proliferação celular as colónias com 50 células ou mais.

Foi também realizada a quantificação da síntese de DNA por incorporação de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), um análogo da timidina, no meio de cultura. Após um período de incubação em condições favoráveis, as células foram tratadas com histamina, clozapina e JNJ28610244 em soluções de concentração de 10 μM durante 48h, sendo um outro grupo de células não tratadas (controlo). Procedeu-se à inativação da peroxidase endógena, seguindo-se a incubação das células com anticorpos monoclonais anti-BrdU de roedor. Posteriormente, adicionou-se anti-corpo monoclonal anti-IgG conjugado com peroxidase e visualizou-se por coloração com diaminobenzidina através de microscopia ótica com recurso a um microscópio Axiolab Karl Zeiss.

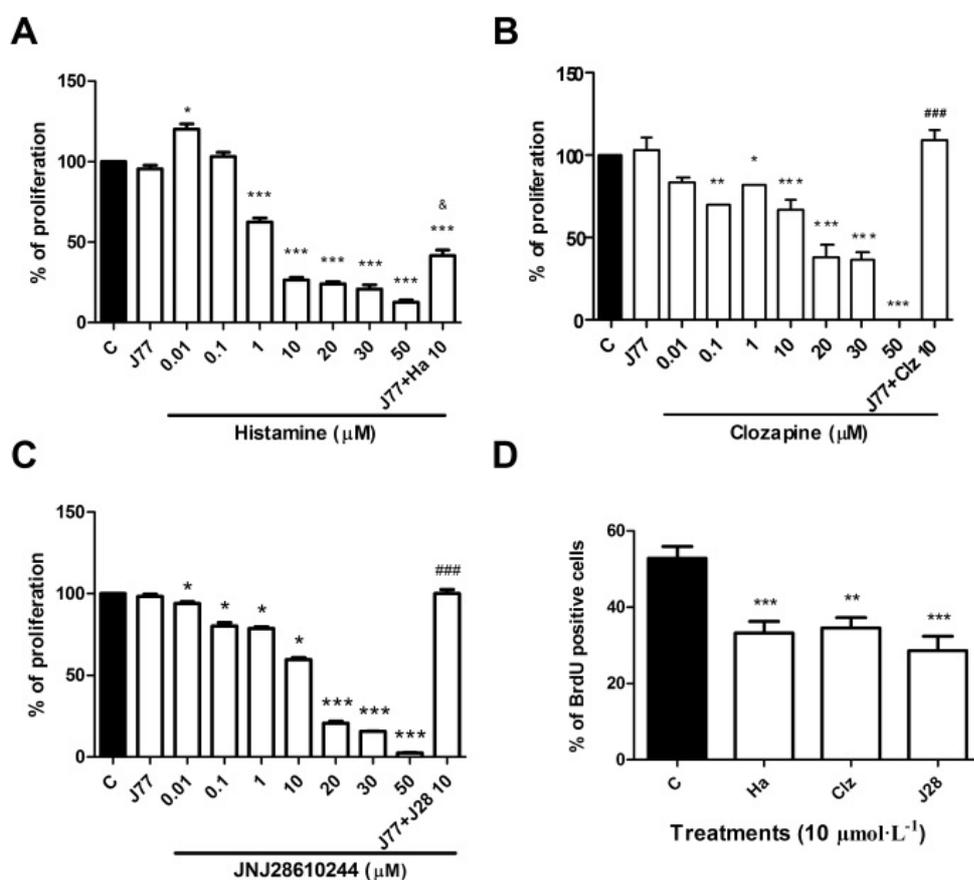


Fig.3: Efeito dos ligandos dos H4R na proliferação celular *in vitro* de MDA-MB-231. Ensaio clonogénico realizado em células não tratadas, tratadas com (A) histamina (Ha), (B) clozapina (Clz) e (C) JNJ28610244 (J28) e/ou JNJ777120 (J77). (D) Incorporação de BrdU no meio com células não tratadas, ou tratadas com Ha, Clz ou J28 durante 48h. Adaptado de [15]

Como visto na figura 3, nos gráficos A, B e C, os resultados do ensaio clonogénico demonstram que a histamina modulou de facto a proliferação celular nas linhas celulares utilizadas de uma forma concentração-dependente. A uma concentração de 10 μM , a proliferação foi reduzida para cerca de 25% em comparação com células não tratadas, e a 50 μM , a mesma foi reduzida para cerca de 10%, apresentando um IC_{50} de 0,64 μM . Os tratamentos com clozapina e com a molécula JNJ28610244 também demonstraram propriedades anti-proliferativas dose-dependente, apresentando um IC_{50} de 11,5 e 13,4 μM , respetivamente, sendo que a adição do antagonista (seletivo para os H4R) JNJ7777120 inibiu completamente o mecanismo anti-proliferativo destes dois agonistas, ao contrário do que acontece no caso da histamina – J77 + Ha 10 μM (A) – em que subsistiu uma redução da proliferação para cerca de 40%. Assim, podemos inferir que o mecanismo antiproliferativo está relacionado com a ativação dos H4R, no caso da clozapina e da JNJ28610244, sendo que no caso da histamina, este pode estar relacionado com a sua ligação a outros receptores.

Adicionalmente, no gráfico D, verificamos que, em concordância com os últimos resultados, a incorporação de BrdU foi também significativamente reduzida depois do tratamento com Ha, Clz e J28.

Num outro ensaio, colocaram-se as células em contacto com RNA *small interfering* (siRNA) silenciador da sequência codificadora dos receptores H4R. A adição destes pequenos fragmentos de RNA causa a inibição da expressão do gene que codifica para o H4R. Após a quantificação de DNA celular nas placas de cultura, pela incorporação de BrdU (como descrito acima), foi possível avaliar a influência da presença dos H4R na proliferação celular.

Os resultados demonstraram que houve bloqueio do mecanismo anti-proliferativo da histamina nas células em que se procedeu ao silenciamento da sequência codificadora dos H4R pela adição do siRNA, provando também que esse mecanismo está estritamente relacionado com formação do complexo agonista-H4R e não pela ligação dos agonistas a outros alvos moleculares.

A determinação do potencial apoptótico foi feita através de um ensaio designado TUNEL - método de marcação de nicks por dUTP com ação da deoxinucleotidil transferase - em células não tratadas e outras tratadas com soluções de concentração 10 μM de histamina, clozapina ou JNJ28610244 por um período de 48h. Este método permite detetar fragmentos de cadeia simples ou dupla de DNA (nicks) que ocorrem em consequência do processo apoptótico. As células foram também visualizadas ao microscópio Axiolab Karl Zeiss.

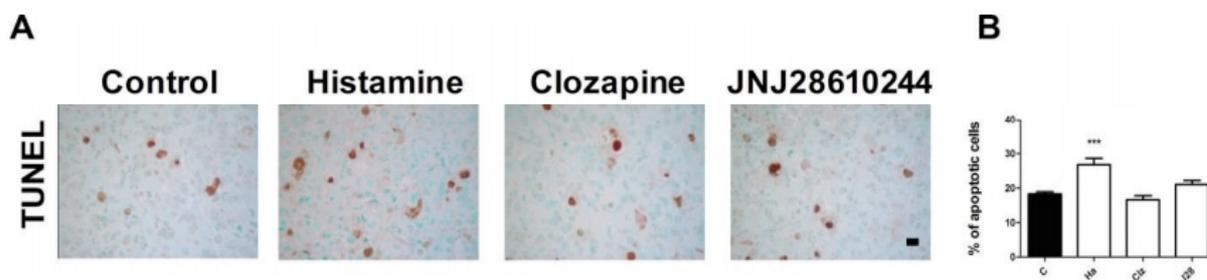


Fig.4: (A) Imagens representativas do ensaio TUNEL e (B) quantificação de células apoptóticas por contagem em 10 campos escolhidos aleatoriamente. Adaptado de [15]

Na imagem A visualizamos, coradas a vermelho, as células apoptóticas num campo de visualização. Posteriormente foi efetuada a média da contagem destas células em 10 campos escolhidos aleatoriamente, estando estes resultados ilustrados no gráfico B. Este método revelou um elevado aumento (em relação ao grupo controlo) da taxa de células apoptóticas quando tratadas com Ha (de 18 para 28%) e um menor aumento com J28 (de 18 para 22%), sendo que a Clz não demonstrou resultados favoráveis à potenciação da apoptose.

Foram também realizados ensaios *in vivo* e *ex vivo* para a avaliação da evolução do crescimento tumoral e para realização de estudos histopatológicos e imunohistoquímicos. A média de tempo de sobrevivência foi também averiguada.

Para isso, utilizaram-se ratinhos livres de patógenos, tendo-se procedido à injeção de células MDA-MB-231 no flanco direito dos roedores e esperando o desenvolvimento do tumor até aos 100-150 mm³. Aí, os roedores foram separados em 4 grupos e receberam injeções diárias de soluções salinas (grupo de controlo, n = 20), soluções de Histamina (5 mg.kg⁻¹, n = 14), clozapina (1 mg.kg⁻¹, n = 14), JNJ28610244 (10 mg.kg⁻¹, n = 14).

Para determinação da evolução do crescimento tumoral e realização de estudos histopatológicos e imunohistoquímicos, metade dos animais de cada grupo foram sacrificados aos 45 dias após início do tratamento. Os dados relativos à dimensão dos tumores, expressos em volume esférico e medidos 3 vezes por semana, foram comparados à dimensão dos mesmos no início do tratamento.

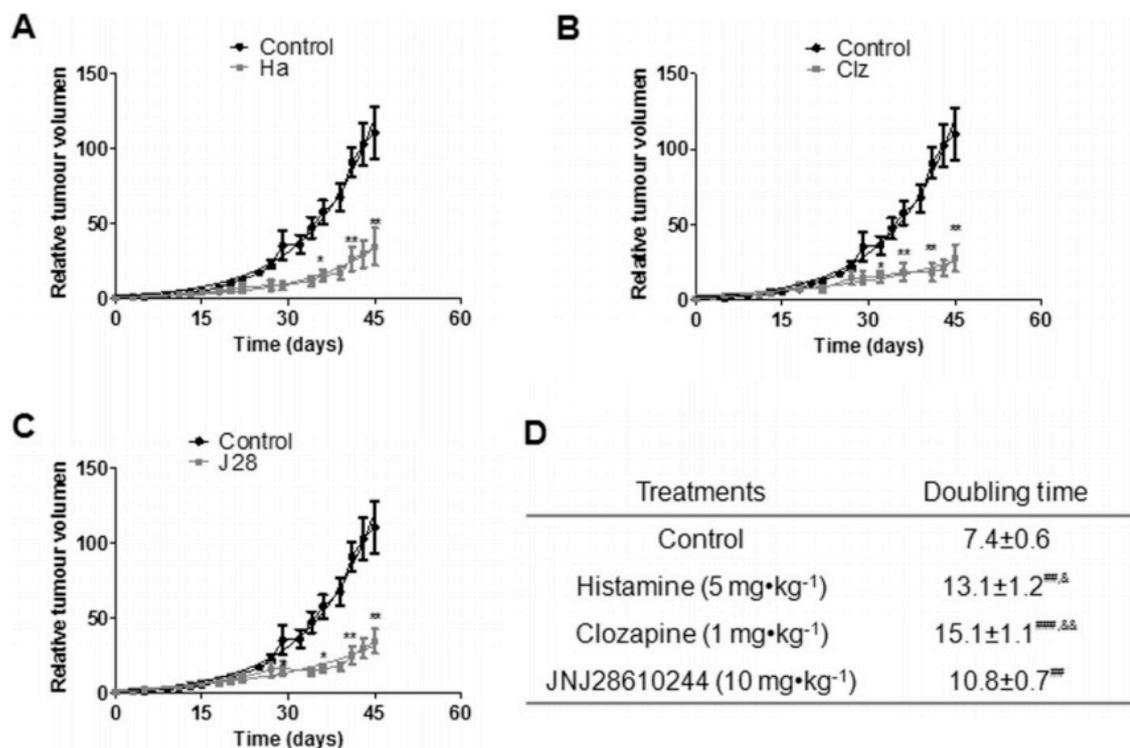


Fig.5: Efeito dos ligandos dos H4R no volume do tumor MDA-MB-231 xenotransplantado para os flancos dos ratinhos. Volume relativo do tumor no grupo controlo vs. (A) histamina (Ha, 5mg.kg⁻¹), (B) clozapina (Clz, 1mg.kg⁻¹), (C) JNJ28610244 (J28, 10mg.kg⁻¹). (D) Tempo médio de duplicação do volume tumoral de cada grupo, em dias. Adaptado de [15]

Na figura 5, nos gráficos A, B e C, verificamos que, respetivamente, a Ha, Clz e a J28 atrasaram a evolução do crescimento do tumor, sendo que na tabela D conseguimos observar que o tempo de duplicação do tumor aumentou de 7.4 ± 0.6 dias no grupo controlo, para 13.1 ± 1.2 (Ha), 15.1 ± 1.1 (Clz) e 10.8 ± 0.7 dias (J28).

Foi observada também a imunoreatividade de moléculas de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), proteínas marcadoras da proliferação celular. A sua detecção foi realizada ao usar um anticorpo de ratinho anti-PCNA conjugado com peroxidase, sendo posteriormente visualizado por coloração com diaminobenzidina.

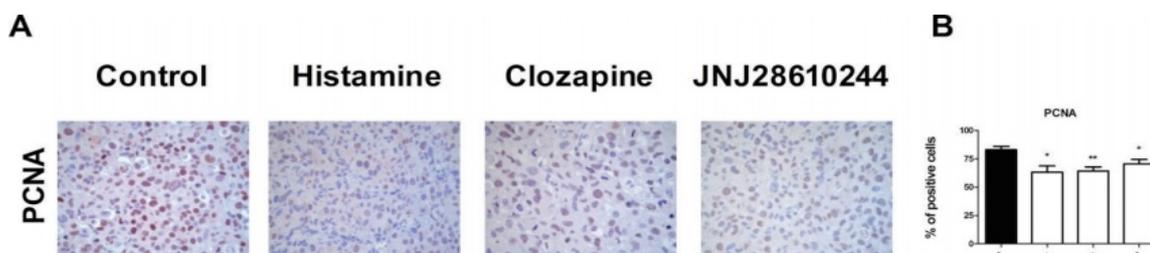


Fig.6: (A) Imagens representativas da imunoreatividade do PCNA obtidas do estudo imunohistoquímico e (B) gráfico representante da quantificação de células nas quais se encontrou o mesmo marcador por contagem em 10 campos escolhidos aleatoriamente. Adaptado de [15]

Foi observado um decréscimo nos níveis de expressão de PCNA nos tumores que sofreram tratamento, como visualizado na figura 6 (diminuição do número de complexos anticorpo-PCNA).

Os estudos histopatológicos foram realizados por exame de seções tecidulares após se proceder à técnica de coloração hematoxilina-eosina. Estes permitiram concluir os tumores eram constituídos por células indiferenciadas e que os mesmos não sofreram alterações significativas após os tratamentos.

A outra metade dos roedores com xenoinxertos foi tratada até morte espontânea de forma a poder traçar a curva de sobrevivência e calcular o tempo médio de sobrevivência.

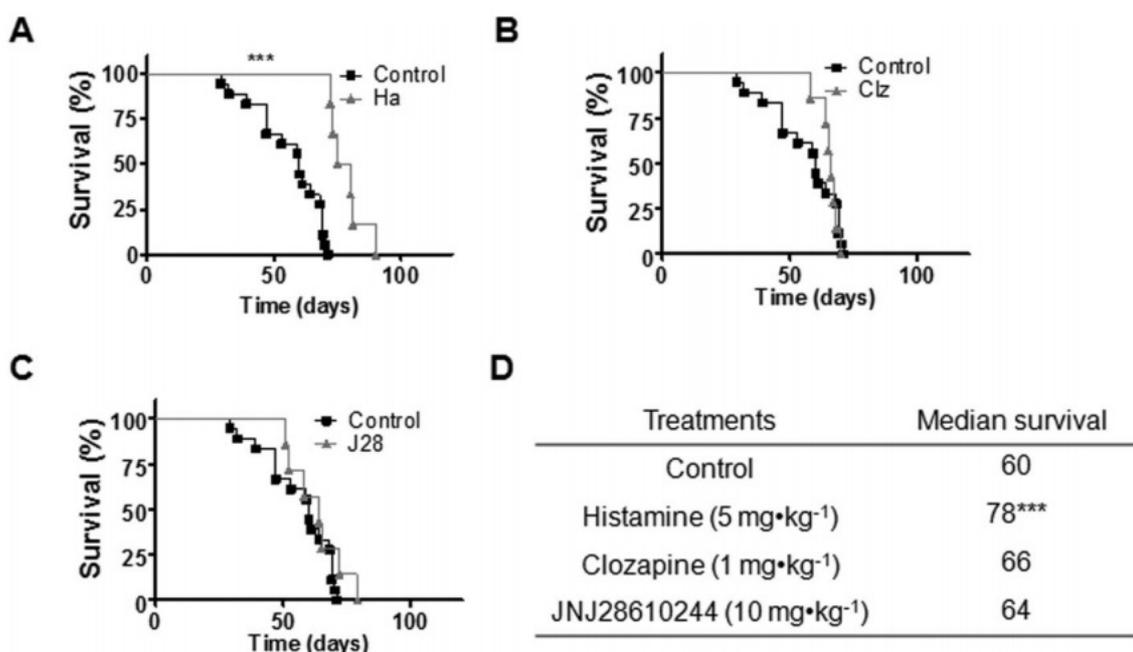


Fig. 7: Taxa de sobrevivência dos ratinhos sujeitos ao processo de xenotransplante. Tratamento diário por injeção de tampão salino no grupo de controlo vs. (A) histamina (Ha, 5mg.kg⁻¹), (B) clozapina (Clz, 1mg.kg⁻¹) e (C) JNJ28610244 (J28, 10mg.kg⁻¹), 5 dias por semana até à morte espontânea. (D) Tempo médio de sobrevivência dos diferentes grupos. Adaptado de [15]

A análise da figura 7 permite verificar que o tratamento com histamina permitiu um aumento do tempo médio de vida de 60 para 78 dias, sem que se observasse diferenças significativas nos casos em que houve tratamento com clozapina ou J28610244.

Foi também realizada uma análise da vascularização pela técnica de coloração tricrômica de Massons de forma a identificar as áreas com maior vascularização. Assim, realizou-se a contagem de vasos intratumorais por observação ao microscópio ótico Axiolab Karl Zeiss.

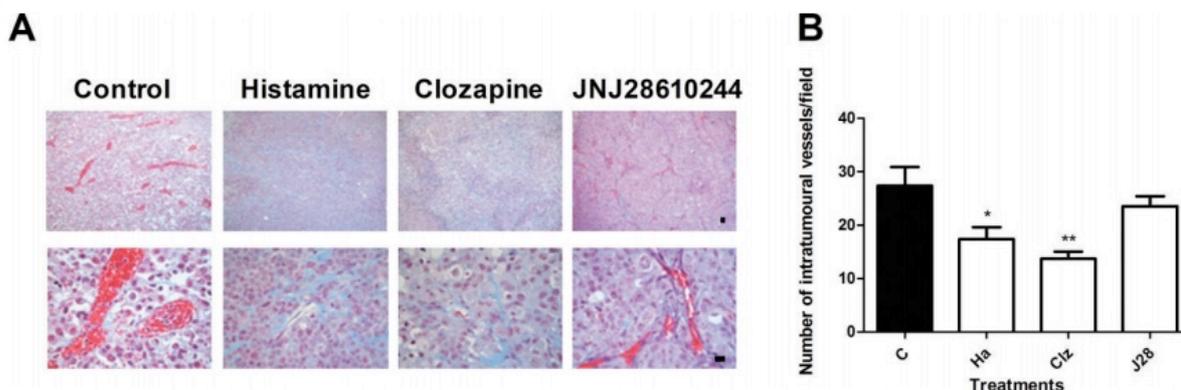


Fig. 8: Efeito dos ligandos dos H4R na vascularização tumoral. (A) Imagens representativas da coloração tricrômica de Massons (em cima ampliação de 100x e em baixo 630x). (B) Número médio de vasos intratumorais contados em 10 campos escolhidos aleatoriamente. Adaptado de [15]

Os resultados mostraram que, no grupo de animais não tratados, os tumores possuíam numerosos vasos de grandes dimensões, havendo uma redução neste número após tratamento com histamina e clozapina, como observado na figura 8.

Por fim, procedeu-se a um ensaio de avaliação do crescimento tumoral pelo tratamento dos tumores xenotransplantados com duas outras moléculas:

Tabela 2: Moléculas utilizadas nos ensaios. Imagens adaptadas de [17].

JNJ10191584	JNJ10181457
Antagonista H4R	Antagonista H3R

Os resultados do ensaio mostraram que, no grupo tratado com JNJ10191584, a sobrevivência média foi reduzida após tratamento, não havendo alterações no volume tumoral. Já do tratamento com JNJ10181457, resultou uma inesperada redução do crescimento tumoral sem alteração na sobrevivência.

4.2. MELANOMA

O melanoma apresenta-se como a forma mais perigosa de cancro da pele, tendo origem nos melanócitos (responsáveis pela produção de melanina) localizados na epiderme. Apresenta-se como um problema de saúde global, surgindo cerca de 132.000 casos por ano e, apesar de apenas constituir cerca de 5% dos casos de cancro da pele, o melanoma é o mais fatal.¹⁸

Esta doença é diagnosticada na clínica em diferentes estádios de evolução, sendo que numa primeira fase, o melanoma começa por ser uma marca pigmentada na pele que se torna palpável e que se alarga sob a forma de um círculo imperfeito. Esta é denominada “fase de crescimento radial”. Na fase seguinte de progressão, designada por “fase de crescimento vertical”, a marca evolui para um nódulo, podendo tornar-se ulcerada.¹⁹

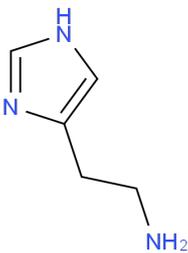
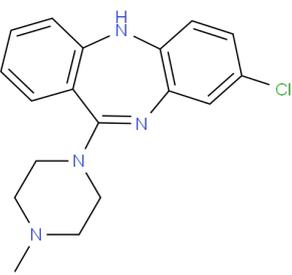
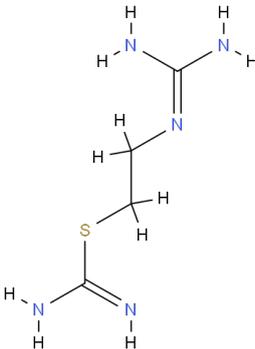
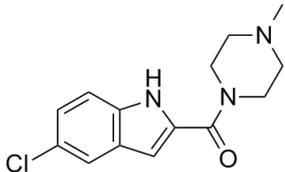
A expressão dos 4 subtipos de recetores da histamina em linhas celulares de melanoma já foi previamente descrita, estando comprovada a expressão dos H4R em biópsias de melanoma humano, o que confirma que este receptor não se encontra apenas em linhas celulares de modelos experimentais.²⁰

Foi também já reportado que o efeito inibitório na proliferação celular da histamina é mediado parcialmente pela estimulação dos H4R, estando associado a um mecanismo de promoção da senescência celular. Além disso, a histamina revelou propriedades indutoras da melanogénese pela ativação dos H2R em linhas celulares de melanoma, sugerindo que a mesma poderá vir a ser utilizada como um agente de pigmentação no tratamento do vitiligo.²⁰

Resultados de um estudo de Noelia A. Massari²¹ e outros colaboradores, realizado em 2013, demonstraram a presença de H4R em linhas celulares e biópsias de melanoma humano. O estudo intitulado “Antitumor activity of histamine and clozapine in a mouse experimental model of human melanoma” tem como objetivos a investigação de alterações nas vias de transdução de sinal e na resposta biológica em linhas celulares de melanoma humano levadas a cabo pela ativação dos H4R.

As linhas celulares utilizadas neste estudo foram a WM35, correspondente a um melanoma humano primário na fase de crescimento radial e a MI/15, derivada de uma metástase no fígado em fase de crescimento vertical, sendo que ambas foram colocadas num meio de cultura favorável ao seu crescimento para posterior utilização em diferentes ensaios. Foram também utilizados diferentes ligandos dos H4R, tal como no estudo referido em 4.1:

Tabela 3: Moléculas utilizadas nos ensaios. Imagens adaptadas de ^[16,17].

Histamina	Clozapina	VUF 8430	JNJ7777120
			
Molécula biológica, agonista de alta afinidade não seletiva para os H4R, apresentando reatividade cruzada com todos os subtipos de receptores.	Antipsicótico atípico, agonista de alta afinidade e seletividade para os H4R; aprovado para uso em humanos.	Agonista H4R	Antagonista de referência, com menos afinidade do que a histamina, utilizado para avaliar a atividade da clozapina como agonista.

Foram realizados diferentes ensaios *in vitro* de forma a estudar a proliferação e senescência celular, o ciclo celular e a fosforilação do complexo ERK1/2.

Para o estudo da proliferação celular foi realizado um ensaio clonogénico, em que as linhas celulares supracitadas foram colocadas em placas de cultura de 6 poços (1000 células por poço) e foram tratadas com soluções de 0.01 até 10 μ M de clozapina e/ou 10 μ M de JNJ7777120, com existência de um grupo controlo não tratado. As células foram sujeitas a incubação durante 7 dias, sendo posteriormente fixadas com formaldeído a 10% v/v em PBS e coradas com azul de toluidina a 1% v/v em etanol a 70%. As colónias contendo 50 células ou mais foram consideradas como resultados positivos para proliferação celular.

Foi também quantificada a síntese de DNA por incorporação de BrdU no meio de cultura. Procedeu-se a um ensaio de condições semelhantes às referidas no ponto 4.1 da presente monografia. Assim, as células foram tratadas com soluções de 10 μM de clozapina e/ou 10 μM da molécula JNJ777120 (antagonista) durante 48h. Seguiu-se a adição de BrdU (30 μM) ao meio de cultura durante 2h, com posterior incubação de anticorpos monoclonais anti-BrdU de roedor. A quantificação foi feita por imunofluorescência com utilização de um anticorpo IgG de roedor, conjugado com isotiocianato de fluoresceína e 4,6-diamino-2-fenilindol através de microscopia ótica com recurso a um microscópio Olympus BX50.

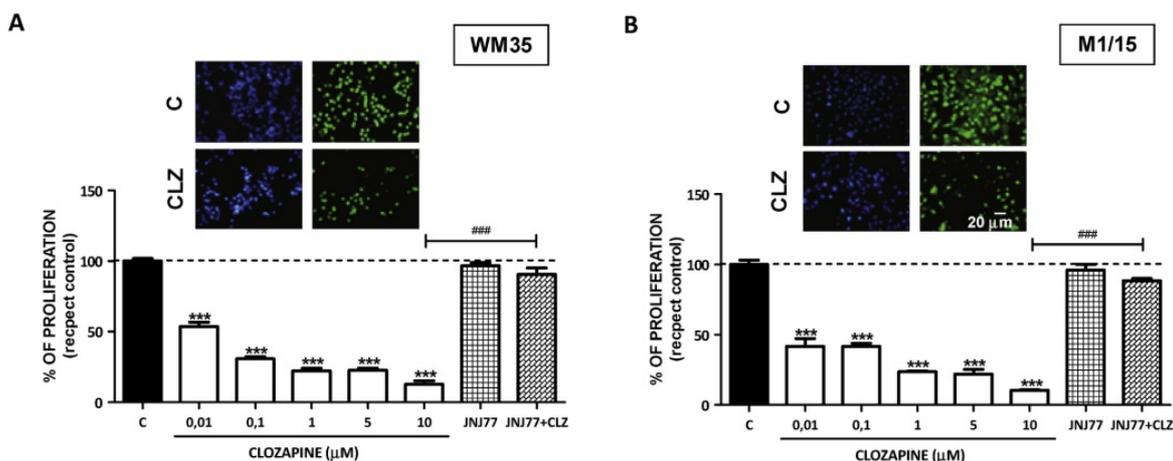


Fig.9: Gráficos representativos dos resultados do ensaio clonogénico relativos ao efeito da clozapina como agonista dos H4R na proliferação na linha celular WM35 (A) e M1/15 (B); Imagens resultantes do método de incorporação de BrdU por utilização de um anticorpo conjugado com 4,6-diamino-2-fenilindol (a azul) ou isotiocianato (a verde) no grupo controlo e no grupo tratado com clozapina. Adaptado de [21]

Como podemos ver na figura 9, no gráfico representativo do ensaio clonogénico, a clozapina demonstrou um efeito anti-proliferativo dose-dependente, apresentando um máximo de inibição para concentrações entre 1 e 10 μM em ambas as linhas celulares em estudo. O facto de este efeito ter sido bloqueado pela adição de um antagonista seletivo para os H4R (JNJ77) mostra que a inibição da proliferação é consequência da formação do complexo agonista-H4R e não da ligação da clozapina a outros recetores.

Para estudo da senescência celular, procedeu-se a uma técnica de coloração proposta em 1995 por Dimri e outros colaboradores²², que consiste na deteção da enzima β -galactosidase como biomarcador de senescência celular. As células senescentes são caracterizadas por uma redução do tamanho dos telómeros (perda da capacidade proliferativa) e por ativação de genes de supressão tumoral.

Assim, inicialmente, procedeu-se à transferência das linhas celulares para placas de cultura de 12 poços (25.000 células por poço), passando estas a ser tratadas com soluções de clozapina e/ou JNJ777120 em concentrações de 10 μM , durante 48h. Posteriormente, as

células foram fixadas e incubadas a 37°C durante 8h com uma solução de 5-bromo-4-cloro-idolil-β-galactosido tamponizada. Por fim, procedeu-se à coloração com hematoxilina com posterior contagem das células que possuem β-galactosidase na sua constituição, com recurso a microscopia ótica por utilização de um microscópio Axiolab Karl Zeiss.

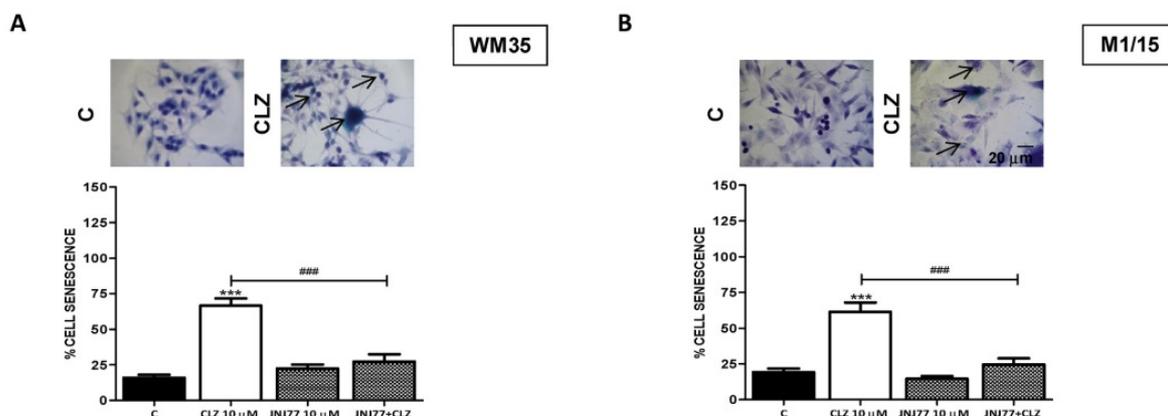


Fig.10: Estudo do efeito da clozapina e/ou JNJ777120 na senescência celular nas linhas celulares WM35 (A) e M1/15 (B). Imagens e gráficos resultantes do método de coloração de senescência associada à presença de β-galactosidase. As setas nas imagens indicam células senescentes. Adaptado de [21]

Como visto na figura acima, o tratamento com clozapina aumentou a percentagem de células senescentes em relação ao grupo controlo (66.4% na WM35; 61,3% na M1/15). Verificou-se também que, tal como o bloqueio do efeito proliferativo, o antagonista JNJ777120 bloqueou o efeito de pró-senescência da clozapina.

Procedeu-se também à análise do ciclo celular das duas linhas celulares em placas de cultura sujeitas a tratamento com soluções de histamina, VUF 8430 ou clozapina, todas elas de concentração 10 μM, havendo um grupo de controlo composto por células não tratadas. As células foram colhidas em momentos diferentes por tripsinização (dissociação celular mediada por tripsina), fixadas com metanol a baixa temperatura, centrifugadas e resuspensas numa solução de iodeto de propídeo, um agente de coloração que penetra na célula quando existe perda de integridade da membrana celular. Por fim, utilizou-se a citometria de fluxo para avaliar as amostras.

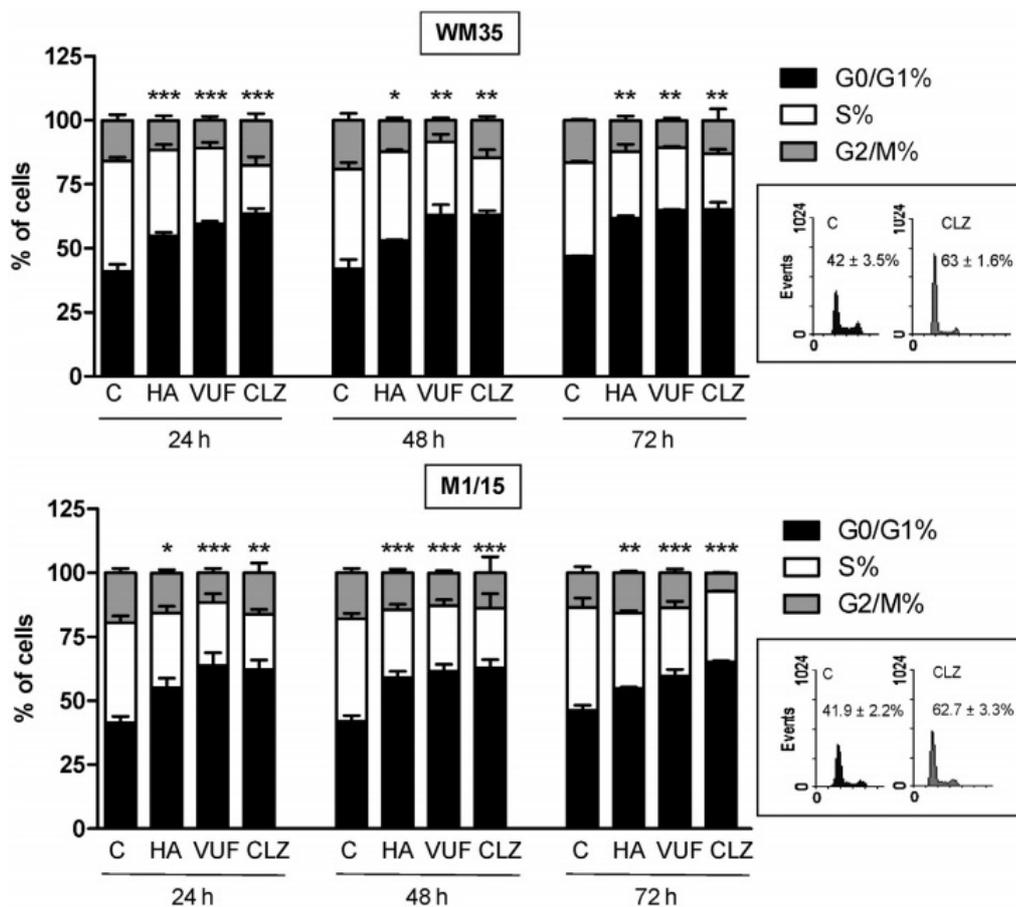


Fig. 11: Gráfico representativo das diferentes fases do ciclo celular em que se encontravam as células WM35 e M1/15 em colheitas realizadas às 24, 48 e 72h – percentagem média de células em diferentes fases do ciclo celular com recurso a uma técnica de citometria de fluxo. Adaptado de [21]

As células das duas linhas celulares de melanoma humano foram encontradas em diferentes fases do seu ciclo celular após fixação em diferentes momentos. Analisando os gráficos constantes na figura 11, verificamos que, do tratamento com os agonistas dos H4R, resultou uma elevada acumulação de células na fase G0/G1 em comparação às fases S, G2 e M. A clozapina foi a molécula que teve mais influência neste evento na maioria dos ensaios. Assim, é possível inferir que a estimulação dos H4R apresenta capacidade de paragem do ciclo celular (mecanismo antiproliferativo).

A quantificação da fosforilação do complexo ERK1/2 foi avaliada por um ensaio Western Blot. O objetivo deste ensaio é verificar o estado de ativação da via MAPK (Proteínas quinase ativadas por mitógenos), sendo esta uma via que se encontra desequilibrada em células tumorais, principalmente em casos de melanoma, estando ativada em até 90% de casos desta doença.¹⁹

A ativação do complexo ERK1/2 desencadeia várias respostas celulares como a proliferação, migração, diferenciação, senescência e morte. Além disso, esta pesquisa foi

particularmente incluída neste artigo, pois Massari (juntamente com outros colaboradores) já tinha colocado a hipótese de que a ativação dos H4R promovia os mecanismos de senescência e diferenciação celular num estudo anteriormente realizado.

Posto isto, as amostras das linhas celulares foram previamente tratadas com soluções de histamina, VUF 8430, clozapina e/ou JNJ7777120, com concentração de 10 μ M, tendo posteriormente sido preparadas por colheita em solução de PBS gelada e colocadas em tampão RIPA (tampão de ensaio de radioimunoprecipitação) juntamente com inibidores de fosfatases e proteinases. As proteínas resultantes foram fracionadas em géis de poliácridamida na presença de SDS e transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno. Essas membranas foram posteriormente bloqueadas e testadas relativamente à presença do complexo ERK1/2 fosforilado e não fosforilado, por utilização de anticorpos anti-p-ERK1/2 e anti-ERK1/2, respetivamente.

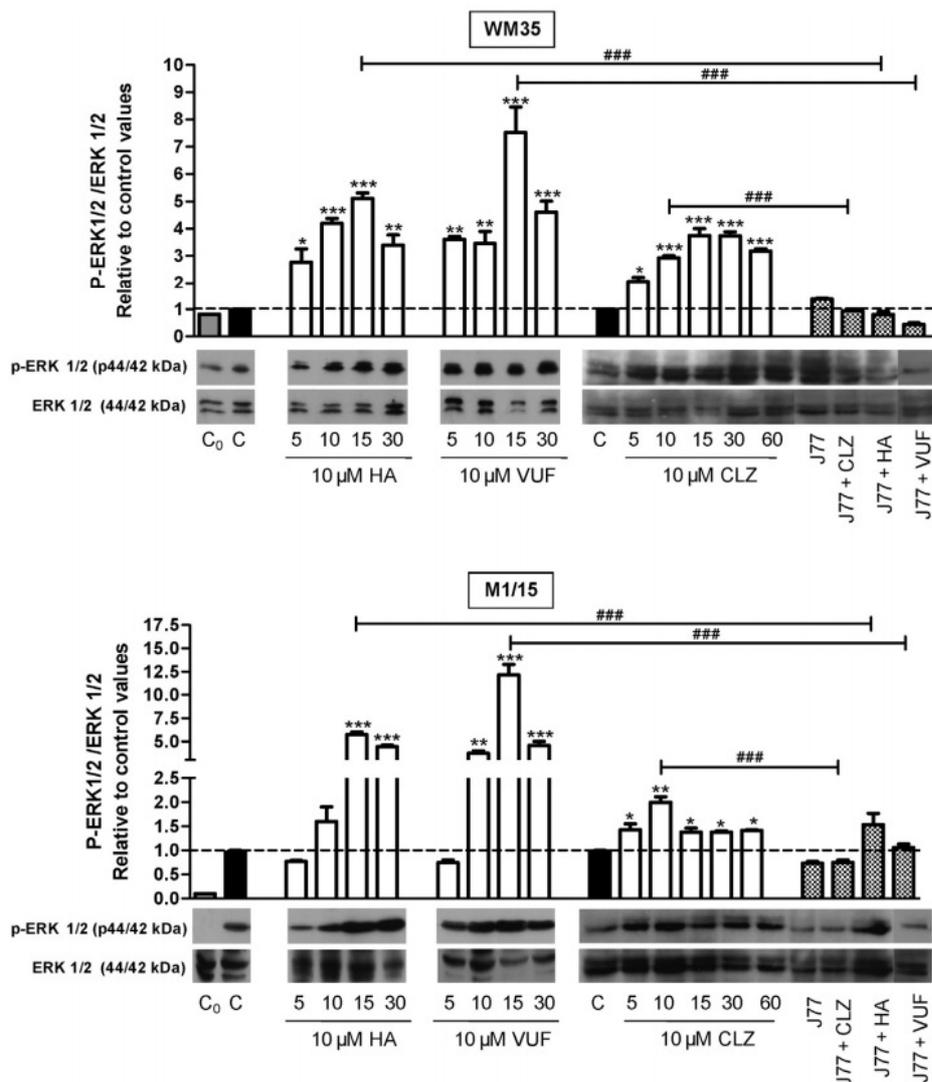


Fig.12: Razão entre o complexo p-ERK1/2 e o ERK1/2 relativamente aos valores do grupo controlo, após tratamento com soluções de histamina ou VUF8430 a 10 μ M, durante 5, 10, 15 e 30 min; com clozapina (10 μ M) durante 5, 10, 15, 30, 60 min. C₀ representa as células em cultura livre de soro (FBS). Resultados também para o tratamento combinado de cada um dos agonistas com o antagonista JNJ7777120 numa solução de concentração 10 μ M. Adaptado de [21]

Como visualizado na figura 12, o tratamento com histamina e outros agonistas dos H4R levaram a uma promoção da fosforilação do complexo ERK1/2 que aumentou em função do tempo nas duas linhas celulares, sendo que a extensão de fosforilação foi semelhante para os agonistas testados. O tratamento com o antagonista JNJ777120 levou à inibição do efeito observado anteriormente, o que demonstra que este foi mediado pela ativação dos H4R.

Os estudos *in vivo* e *ex vivo* realizados consistiram na realização de ensaios sobre a evolução do crescimento tumoral, sobrevivência e de estudos imunohistológicos e histoquímicos com o objetivo de avaliar a atividade antitumoral da histamina e clozapina.

Para isso foram realizados xenotransplantes da linha celular MI/15 por injeção subcutânea no flanco direito dos ratinhos de forma a induzir o desenvolvimento tumoral. Os ratinhos foram depois separados em 3 grupos e receberam uma injeção diária de uma solução salina (grupo controle, n = 14), uma solução de histamina (HA, n = 8) ou clozapina (CLZ, n = 13).

Para a avaliação do crescimento tumoral, trataram-se os ratinhos com soluções de histamina ou clozapina com concentrações de 1 mg.kg⁻¹ durante 70 dias, sendo posteriormente o tumor excisado e considerado o seu volume esférico na construção de uma curva de crescimento tumoral para cada grupo.

A sobrevivência foi avaliada nos ratinhos xenotransplantados até à morte espontânea, tendo sido traçadas as curvas de sobrevivência e calculado o tempo médio de sobrevivência de cada grupo.

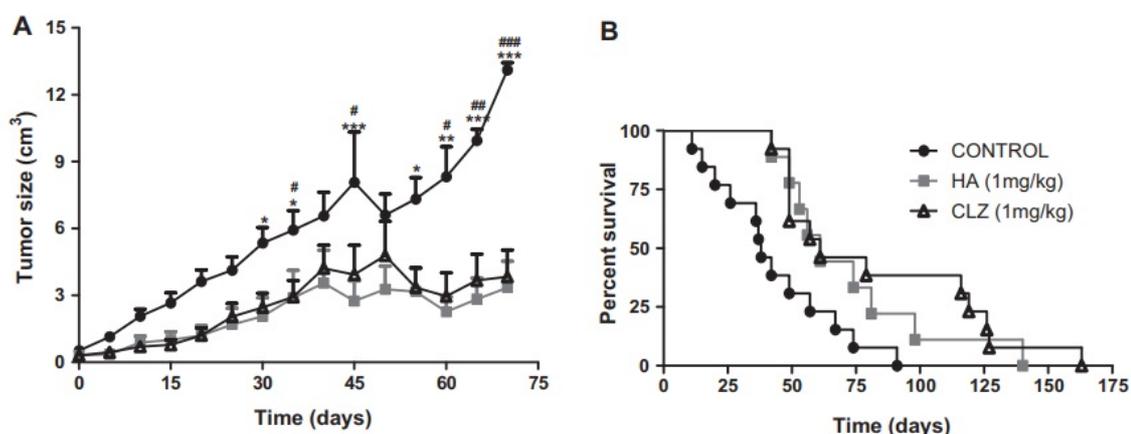


Fig.13: Atividade antitumoral da histamina (HA) e clozapina (CLZ) nos ratinhos xenotransplantados. (A) Representação da evolução temporal do volume do tumor em cm³; (B) Taxa de sobrevivência vs. tempo. Adaptado de [21]

Como podemos ver na figura 13, os tratamentos com histamina e clozapina provocaram uma diminuição no crescimento tumoral, demonstrando também um aumento no tempo médio de sobrevivência dos ratinhos.

Foram também analisados os efeitos da histamina e clozapina nos tumores xenotransplantados ao nível histoquímico. Assim, realizaram-se ensaios de imunocoloração com o objetivo de avaliar o crescimento celular por determinação do PCNA e do índice mitótico (IM), ou seja, o número de células com cromossomas visíveis em campos de ampliação de 400x. A vascularização tumoral foi analisada por coloração tricrômica de Massons, tendo sido observadas as maiores áreas vasculares intratumorais.

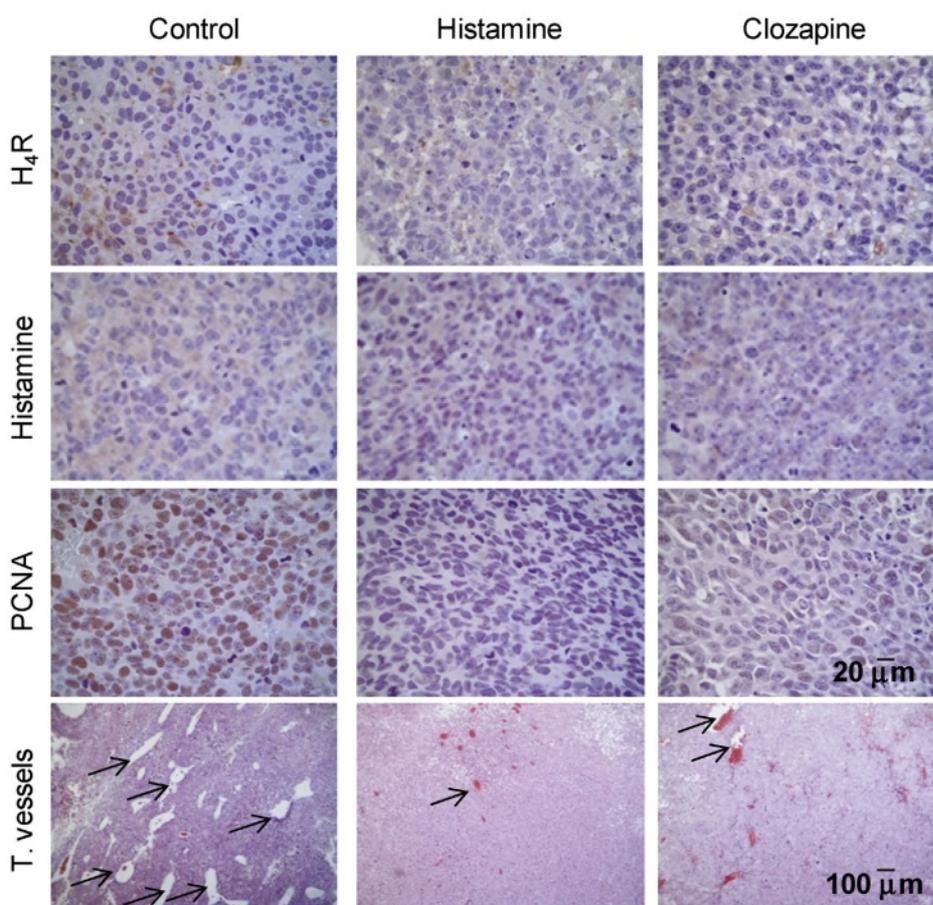


Fig.14: Imagens dos ensaios imunohistoquímicos realizados no ratinhos xenotransplantados com a linha celular MI/15. Comparação do grupo não tratado (controlo) com os tratados com histamina e clozapina ao nível da expressão dos H4R, conteúdo em histamina e expressão de PCNA, com ampliação de 630x. Avaliação da presença de vasos intratumorais com ampliação de 50x (coloração tricrômica de Massons). Adaptado de [21]

Estes ensaios permitiram concluir acerca da existência considerável de conteúdo em histamina e H4R na linha celular MI/15, sem que houvesse diferenças relativas ao tratamento com histamina ou clozapina. Também foi possível observar que os tumores eram constituídos por células altamente indiferenciadas.

Tanto a expressão de PCNA como o IM sofreram uma redução nos grupos de animais tratados com os agonistas. Também nestes, a presença de vasos intratumorais se encontrou diminuída com redução do diâmetro vascular.

5. RECETORES H4 E PESQUISA DE NOVOS LIGANDOS

Após a descoberta dos H4R no ano de 2000, deu-se início à sua caracterização molecular. Este processo foi marcado pela utilização de ligandos com afinidade já confirmada para outros receptores da mesma família (com estrutura semelhante à dos H4R) na construção de modelos de homologia, já que a estrutura tridimensional do receptor não se encontra solucionada.

Assim, verificou-se que a histamina se apresenta como um agonista mais potente para os H4R do que para os outros receptores da mesma família,⁹ sendo que outras moléculas testadas inicialmente foram o Imetit (agonista H3R) e o Clobenpropit (antagonista H3R) que revelaram capacidade agonista para os H4R. Outros compostos selecionados como ligandos seletivos para este recetor foram o OUP-16 e a 4-metilhistamina (compostos imidazólicos), passando a ser também identificados a clozapina, VUF 8430 e a JNJ7777120 como ligandos seletivos para o mesmo receptor, não imidazólicos.⁴

Ao longo dos últimos anos, tem havido um esforço por parte dos investigadores em descobrir novos ligandos viáveis do ponto de vista farmacológico e que possibilitem processos de modificação estrutural com vista à execução de processos de otimização de *leads*, de forma a obter moléculas com um perfil apropriado e com potencial para desenvolvimento clínico – Novas entidades químicas (NCE).

A pesquisa de novos ligandos tem sido efetuada com recurso a métodos de rastreio de elevada capacidade, em inglês, *High-Throughput Screening* (HTS), possibilitados por métodos de química computacional. Como exemplo, e visualizado nos pontos 4.1 e 4.2 da presente monografia, a molécula JNJ7777120, utilizada como antagonista de referência para os H4R, foi descoberta por meio de um processo de HTS e otimizada nos laboratórios Johnson & Johnson.

Um estudo denominado “Discovery of nanomolar ligands with novel scaffolds for the histamine H4 receptor by virtual screening”²³, da autoria de Nicolas Levoine e outros

colaboradores, explora o processo de screening virtual de novos ligandos para os H4R, realizado neste caso, em dois passos:

Em primeiro lugar, pela conceção de um modelo de homologia do H4R a três dimensões com recurso a uma pequena biblioteca de entidades químicas de estrutura variável, permitindo assim o aprofundamento do conhecimento dos locais de ligação do receptor, tendo posteriormente sido identificado um *hit* viável que permitisse o refinamento deste mesmo modelo;

Em segundo lugar, pela realização do processo de screening virtual, com utilização de um grande número de moléculas testadas para descoberta de novos *hits*.

A construção deste tipo de modelo é possibilitada pelo prévio conhecimento da estrutura cristalina de numerosos GPCRs, receptores estes que possuem elevada semelhança estrutural entre si.²³

Inicialmente, o modelo começou a ser desenvolvido por sobreposição da estrutura cristalina da rodopsina bovina e dos GPCRs disponíveis como base para a compreensão estrutural do receptor, tendo sido inicialmente encontrado o HIR. Através do *software* DALI, verificaram-se as semelhanças estruturais entre o modelo tridimensional deste recetor e o do H4R, facto que levou a concluir acerca da precisão do método de construção do modelo.

Posteriormente, passou-se à utilização da molécula JNJ7777120 como um ligando com afinidade para o H4R no aminoácido Glu182 presente no modelo. No entanto, foram encontradas algumas incompatibilidades entre a molécula produzida pela Johnson & Johnson e alguns locais de ligação do presente modelo de homologia, o que fez supôr que o mesmo teria que ser refinado. Para isso, procedeu-se à incorporação do recetor num ambiente membranar com a finalidade de perceber se as alterações conformacionais poderiam encerrar o processo de refinamento, o que, mesmo assim, não foi possível.

Assim, para concluir este processo que visa a obtenção de uma completa compreensão estrutural do recetor, procedeu-se à execução de um processo de *pré-screening* que levou à seleção da pimozida como um ligando de grandes dimensões que permitiu obter uma melhor percepção do volume dos locais de ligação.

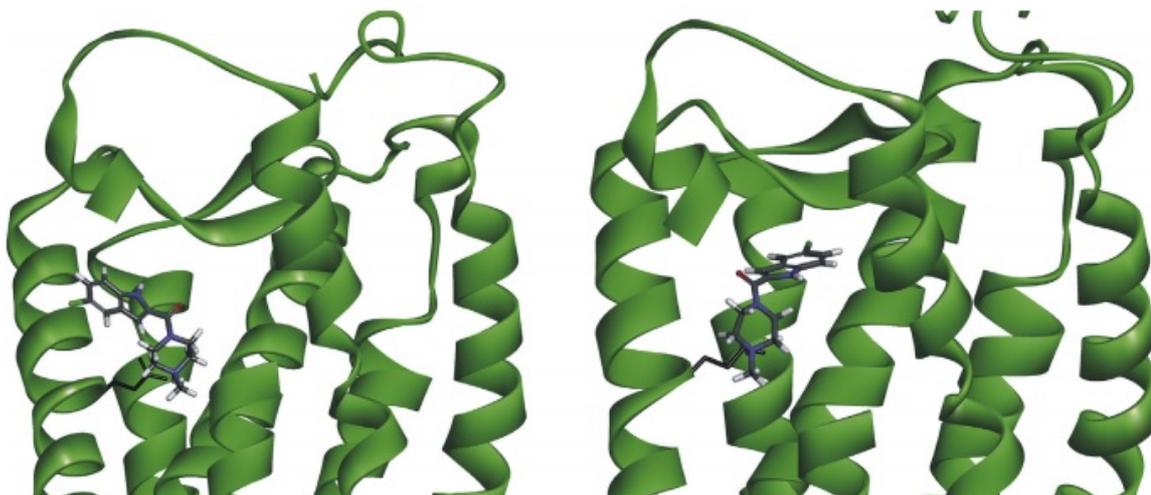


Fig. 15: Modo de ligação da molécula JNJ 777120 no modelo de homologia inicial (à esquerda) e após o processo de refinamento (à direita). Adaptado de [23].

Estes processos que levaram à evolução do modelo de homologia constituem o principal desafio à percepção do modo como os ligandos interagem com os recetores em estudo nas metodologias de R&D.

Após a obtenção do modelo refinado, procedeu-se finalmente à realização do *screening* virtual que contou com uma biblioteca estrutural composta por cerca de 7000 moléculas.

Os resultados desta pesquisa revelaram a existência de 120 hits cuja estrutura foi confirmada por espectrometria de massa e por ressonância magnética nuclear, 28 dos quais foram confirmados experimentalmente, sendo que 9 destes demonstraram uma elevada afinidade para os H4R.

Apesar de apenas 2 dessas estruturas apresentarem atividade agonista com uma baixa afinidade para o recetor, o processo de *screening* virtual demonstrou ser um sucesso, devido ao facto de que essas moléculas constituíam NCE que poderão oferecer novas perspetivas para a investigação em química medicinal relacionada com os H4R.

Este tipo de metodologia deve continuar a ser explorada no futuro de forma a obter novas moléculas com potencial para desenvolvimento clínico.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de toda a investigação em torno da descoberta de novas terapias para os diferentes tipos de cancro, ainda hoje se considera limitado o conjunto de alternativas encontradas, sendo que o tratamento, muitas das vezes, traz resultados indesejados, caracterizados por uma fraca eficácia e elevada toxicidade que em nada beneficiam os doentes.

O futuro passará então, por um aprofundamento da compreensão dos mecanismos que se encontram na génese da doença pelo entendimento das variações moleculares adjacentes à modificação de processos celulares.

Assim, apesar dos inúmeros indícios da presença funcional de H4R em vários tipos de tecidos cancerígenos, o seu papel nos mecanismos e vias biológicas responsáveis pelo crescimento tumoral é dependente do tipo de cancro e deverá continuar a ser estudado. No entanto, é inquestionável a possibilidade de utilização deste recetor como um alvo molecular, mostrando-se significativa a pesquisa de novos ligandos que contribuam para novos avanços na terapia anticarcinogénica.

Até ao momento, a reduzida variedade molecular de agonistas e antagonistas é consequência do escasso número de modelos de homologia (*scaffolds*) utilizados na sua pesquisa, facto que nos impede de conhecer na totalidade estas novas ferramentas farmacológicas que poderão, no futuro, dar respostas para o controlo desta perniciosa patologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS – PARTE III

- 1 – WORLD HEALTH ORGANIZATION – Cancer – Key Facts [acedido a 9 de Agosto de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>;
- 2 – NIH - NATIONAL CANCER INSTITUTE – Types of Cancer Treatment [acedido a 10 de Agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>;
- 3 - NIH - NATIONAL CANCER INSTITUTE – Targeted Cancer Therapies [acedido a 10 de Agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies/targeted-therapies-sheet>;
- 4 - MEDINA, V.A., RIVERA, E.S. - Histamine receptors and cancer pharmacology. Buenos Aires, Argentina: British Journal of Pharmacology, 2010 e referências nele citadas;
- 5 - SCHREEB, A. et al. – Histamine in Cancer. In: STARK, H., Histamine H4 Receptor, a Novel Drug Target for Immunoregulation and Inflammation. Londres, Reino Unido: Versita, 2013. 978-83-7656-056-4, p. 248 e referências nele citadas;
- 6 - WU F, YU J, GEHRING H. - "Inhibitory and structural studies of novel coenzyme-substrate analogs of human histidine decarboxylase". Zurique, Suíça: FASEB Journal, edição 22, p. 890–7;
- 7 - Van Schoor, J. - Antihistamines: a brief review. Professional Nursing Today, Vol.16. África do Sul: MedPharm Publications, 2012. 1607-6672, p. 16–21;
- 8 – Van Rijn, R.M. et al. – Molecular pharmacology of the human histamine H₄ receptor. Amsterdão, Holanda: Leiden/Amsterdam Center for Drug Research p. 8 (2007);
- 9 – SCHREEB, A. et al. – Histamine H4 Receptor Ligands. In: STARK, H., Histamine H4 Receptor, a Novel Drug Target for Immunoregulation and Inflammation. Londres / Reino Unido: Versita, 2013. 978-83-7656-056-4, p. 9-10 e referências nele citadas;
- 10 – ERIKSSON, S. et al. - Omeprazole and H₂-receptor antagonists in the acute treatment of duodenal ulcer, gastric ulcer and reflux oesophagitis: a meta-analysis. Molndal, Suécia: European Journal of Gastroenterology and Hepatology, 1995;
- 11 – Medina, V. et al. – Histamine in Cancer. In: STARK, H., Histamine H4 Receptor, a Novel Drug Target for Immunoregulation and Inflammation. Londres / Reino Unido: Versita, 2013. 978-83-7656-056-4, p. 271-276 e referências nele citadas;
- 12 - BARTHOLEYNS, J., BOUCLIER, M. - Involvement of histamine in growth of mouse and rat tumors: antitumoral properties of monofluoromethylhistidine, an enzyme-activated irreversible inhibitor of histidine decarboxylase. Estrasburgo, França: American Association for Cancer Research, Vol.44, edição 2 (1984). 1538-7445, p. 639-645;

- 13 – RIVERA, E.S. et al. – Histamine as an autocrine growth factor: an unusual role for a widespread mediator. Buenos Aires / Argentina: Seminars in Cancer Biology, 2000, p. 15-23;
- 14 – WORLD HEALTH ORGANIZATION – Breast Cancer [acedido a 10 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en>;
- 15 – LAMAS, D.J. et al. - Therapeutic potential of histamine H4 receptor agonists in triple-negative human breast cancer experimental model. Buenos Aires / Argentina: British Journal of Pharmacology, Vol.170, edição 1 (2013);
- 16 – ChemSpider – Search and share Chemistry [acedido a 29 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.chemspider.com>;
- 17 – MedChemExpress – Master of Small Molecules [acedido a 29 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.medchemexpress.com>;
- 18 – WORLD HEALTH ORGANIZATION – Skin Cancers [acedido a 12 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>;
- 19 - CLINICAL CANCER RESEARCH – Pathology of melanoma [acedido a 12 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/12/7/2308s>;
- 20 – Medina, V. et al. – Histamine in Cancer. In: STARK, H., Histamine H4 Receptor, a Novel Drug Target for Immunoregulation and Inflammation. Londres / Reino Unido: Versita, 2013. 978-83-7656-056-4, p. 255-256 e referências nele citadas;
- 21 - MASSARI, N. et al. - Antitumor activity of histamine and clozapine in a mouse experimental model of human melanoma. Buenos Aires: Journal of Dermatological Science. Vol. 72, edição 3 (2013), p. 252-262 e referências nele citadas;
- 22 – DIMRI, G. et al. – A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. California: Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1995;
- 23 - LEVOIN, N. et al. - Discovery of nanomolar ligands with novel scaffolds for the histamine H4 receptor by virtual screening. França: European Journal of Medicinal Chemistry, 2016 e referências nele citadas;