



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Cecília Moniz Cadima

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Novos Mecanismos de Nitração *in vivo*: o efeito do nitrato da dieta na formação de ácido gordos nitrados com ação anti-inflamatória” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, da Dra. Maria João Moura, do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida e da Professora Doutora Bárbara Silva Rocha apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019

Cecília Moniz Cadima

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Novos Mecanismos de Nitração *in vivo*: o efeito do nitrato da dieta na formação de ácido gordos nitrados com ação anti-inflamatória”, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Maria João Moura, do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida e da Professora Doutora Bárbara Silva Rocha, e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019

1 2  9 0

UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Eu, Cecília Moniz Cadima, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2014202662, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Novos Mecanismos de Nitração *in vivo*: o efeito do nitrato da dieta na formação de ácidos gordos nitrados com ação anti-inflamatória” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 2 de setembro de 2019

Cecilia Moniz Cadima

(Cecília Moniz Cadima)

## **Agradecimentos**

Ao meus pais pelo apoio incondicional que me deram, não só nesta etapa, mas ao longo de toda a minha vida. Por serem o meu exemplo de esforço, dedicação e, acima de tudo, humanidade. À minha irmã Sophie por ser aquela com a qual posso contar, sem receios, sabendo que, por muitos obstáculos que tenhamos de ultrapassar, nos teremos sempre uma à outra. À minha pequena princesa Sara, por me perdoar cada ausência e me receber carinhosamente em cada chegada a casa. Aos meus avós, José e Ercília, por serem os meus eternos velhotes e por me apoiarem e defenderem incondicionalmente. Aos meus amigos de sempre, Rúben e Mélanie, por me acompanharem ao longo de todas as etapas da minha vida, encarando cada um dos meus erros como aprendizagem e por me mostrarem que as amizades verdadeiras são para toda a vida. Ao Emanuel, por acreditar sempre em mim e me fazer sorrir diariamente.

A Coimbra, por me ter mostrado um Mundo novo, por me ter feito crescer enquanto pessoa e por todas as amizades e amores que me proporcionou. Ao meu padrinho Eduardo por me mostrar que podemos atingir todos os nossos objetivos sem deixar de ser humildes e oferecermos toda a nossa amizade. À Daniela, por me manter motivada quando a vontade era desistir, por me ter visto crescer ao longo do meu percurso académico e pela interminável paciência e dedicação. Àquelas que me acompanharam ao longo desta jornada, servindo de inspiração a cada dia, Elodie e Cátia.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e todos os que, estando inseridos nesta, contribuíram para o meu crescimento enquanto estudante, em especial à Professora Doutora Bárbara Silva Rocha, orientadora da presente monografia, pela disponibilidade, simpatia e empenho demonstrados desde o início.

À Dra. Maria João Moura, pela oportunidade fornecida e toda a compreensão transmitida ao longo do estágio. A toda a equipa da Farmácia Central de Cantanhede, que me receberam com um carinho difícil de descrever e mostraram que todas as dificuldades pelas quais os profissionais passam são, na verdade, desafios que nos dão ferramentas para nos tornarmos em profissionais de excelência. Levo do meu estágio em farmácia comunitária novas amigas com as quais sei que poderei sempre contar. Obrigada!

Ao Professor Doutor Luís Pereira de Almeida por me aceitar na sua equipa com enorme carinho e completa disponibilidade. A todo o grupo do Centro de Neurociências de Coimbra que me acolheu, pela paciência, compreensão e ensinamentos disponibilizados, sendo cada um deles um exemplo de paixão pela profissão.

## Índice Geral

Índice de Figuras.....	7
Índice de Tabelas.....	7
<b>Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária</b>	
Lista de Abreviaturas.....	9
1. Introdução.....	10
2. Análise SWOT.....	11
2.1. Pontos Fortes.....	11
2.1.1. Sequenciação na realização de tarefas.....	11
2.1.1.1. Atividades de <i>back office</i> .....	12
2.1.1.2. Atividades de <i>front-office</i> .....	12
2.1.2. População heterogénea.....	13
2.1.3. Grande diversidade de produtos.....	14
2.1.4. Profissionais competentes, equipa dinâmica e aprendizagem rigorosa.....	14
2.1.5. Contacto com o Sifarma 2000®.....	15
2.1.6. Serviços farmacêuticos diversificados.....	15
2.1.7. Preparação de manipulados e extemporâneos.....	16
2.2. Pontos Fracos.....	17
2.2.1. Proximidade dos pontos de atendimento.....	17
2.3. Oportunidades.....	17
2.3.1. Variedade crescente de produtos no mercado e grande afluência diária de utentes.....	17
2.3.2. Existência de medicamentos não sujeitos a receita médica de dispensa exclusiva em farmácia.....	18
2.3.3. Desafios impostos por diferentes variáveis que conduzem à aprendizagem.....	18
2.3.3.1. Carências económicas populacionais.....	19
2.3.3.2. Medicamentos esgotados.....	19
2.3.3.3. Pedidos de medicamentos sujeitos a receita médica sem a apresentação da mesma.....	19
2.4. Ameaças.....	20
2.4.1. Outros postos de venda restringem os atendimentos realizados.....	20
2.4.2. Sifarma 2000®: uma perspetiva diferente do <i>software</i> .....	20
2.4.3. A <i>internet</i> como fonte de autodiagnóstico.....	21
3. Casos Práticos.....	21
3.1. Dermatite de contacto.....	21
3.2. Picada de inseto.....	22
4. Conclusão.....	23

5. Referências Bibliográficas.....	25
6. Anexos.....	26
Anexo 1: Receita Eletrônica do Manipulado “Pomada de Enxofre 6%”.....	26
Anexo 2: Ficha de Preparação semi-preenchida do Manipulado “Pomada de Enxofre 6%”.....	27
Anexo 3: Caixa Rotulada do Manipulado “Pomada de Enxofre 6%”.....	28
Anexo 4: Cálculo do Preço de Venda ao Público do Manipulado “Pomada de Enxofre 6%”.....	29
Anexo 5: Interação entre o Ibuprofeno e a Varfarina.....	30
Anexo 6: Fluxograma de Indicação Farmacêutica de “Picada do Inseto” (ANF).....	31

## **Parte II – Relatório de Estágio em Investigação Científica**

1. Introdução.....	33
2. Análise SWOT.....	34
2.1. Pontos Fortes.....	34
2.1.1. Observação de diversos procedimentos que envolvem a utilização de animais de laboratório.....	34
2.1.1.1. Testes de comportamento animal.....	35
2.1.1.2. Análise dos resultados obtidos nos testes de comportamento animal.....	37
2.1.1.3. Cirurgias em animais.....	38
2.1.1.4. Sacrifício de animais e posterior colheita de cérebros.....	38
2.1.2. Observação de cortes de cérebros.....	39
2.1.3. Execução de imunohistoquímica.....	39
2.1.4. Extração de DNA plasmídico de bactérias.....	39
2.1.5. Extração de RNA e proteína pelo método de trizol.....	40
2.1.6. Equipamento variado.....	40
2.1.7. Realização de uma formação de sala de culturas.....	41
2.1.8. Rotatividade de atividades.....	42
2.1.9. Equipa dinâmica e de excelência.....	42
2.2. Pontos Fracos.....	42
2.2.1. Impossibilidade de contacto com alguns equipamentos devido à sua ausência.....	42
2.3. Oportunidades.....	43
2.3.1. Facilidade na procura e troca de informação científica.....	43
2.3.2. Horários flexíveis dos profissionais.....	43
2.4. Ameaças.....	44
2.4.1. Restrição da informação autorizada a transmitir.....	44
2.4.2. Não ter o curso de experimentação animal.....	44
3. Conclusão.....	44

4. Referências Bibliográficas.....	46
5. Anexos.....	47
Anexo 1: Análise das passadas obtidas no teste de comportamento animal <i>footprint</i> ...	47
Anexo 2: Atlas do cérebro de murganho.....	47
Anexo 3: <i>Rotarod</i> .....	48
Anexo 4: Criostato.....	48
Anexo 5: Quadro estereotáxico.....	49
<b>Parte III – “Novos Mecanismos de Nitração <i>in vivo</i>: o efeito do nitrato da dieta na formação de ácidos gordos nitrados com ação anti-inflamatória”</b>	
Lista de Abreviaturas.....	51
1. Abstract/Resumo.....	53
2. Introdução.....	55
3. Síntese de ácidos gordos nitrados.....	57
3.1. Mecanismos de nitração de ácidos gordos insaturados.....	57
3.2. O papel do óxido nítrico na nitração de ácidos gordos.....	60
3.3. O efeito da dieta na nitração de ácidos gordos: novos mecanismos de nitração...	60
4. Propriedades químicas, metabolismo e distribuição dos ácidos gordos nitrados.....	62
5. Sinalização celular mediada pelos ácidos gordos nitrados.....	63
5.1. Regulação da via de sinalização do NF-kB.....	63
5.2. Ativação diferencial dos PPARs.....	64
5.3. Impacto na transcrição de genes dependentes do Nrf2 .....	66
5.4. Indução da transcrição pelo HSF-I .....	67
6. Potencial farmacológico dos ácidos gordos nitrados.....	68
6.1. Ácidos gordos nitrados na esteatose hepática.....	69
6.2. Ácidos gordos nitrados na doença renal.....	70
6.3. Ácidos gordos nitrados no cancro da mama triplo negativo.....	72
6.4. Ácidos gordos nitrados na aterosclerose .....	73
7. Conclusão.....	75
8. Referências Bibliográficas.....	77

## Índice de Figuras

### **Parte III – “Novos Mecanismos de Nitração *in vivo*: o efeito do nitrato da dieta na formação de ácido gordos nitrados com ação anti-inflamatória”**

Figura 1: Mecanismos de nitração propostos para a formação de NO <sub>2</sub> -FA a partir de ácidos gordos poli-insaturados bis-alílicos.....	57
Figura 2: Mecanismos de nitração do Ácido Linoleico conjugado.....	58
Figura 3: Auto-oxidação do radical <sup>•</sup> NO.....	59

## Índice de Tabelas

### **Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária**

Tabela I: Análise SWOT.....	11
-----------------------------	----

### **Parte II – Relatório de Estágio em Investigação Científica**

Tabela I: Análise SWOT.....	34
-----------------------------	----



# PARTE I

## RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

## **Lista de Abreviaturas**

**ANF** - Associação Nacional das Farmácias

**BPF** - Boas Práticas Farmacêuticas para a farmácia comunitária

**DCI** - Denominação Comum Internacional

**LEF** - Laboratório de Estudos Farmacêuticos

**MNSRM** - Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

**MNSRM-EF** - Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica de dispensa Exclusiva em Farmácia

**MSRM** - Medicamento Sujeito a Receita Médica

**PVP** - Preço de Venda ao Público

**SPD** - Sistema Personalizado de Dispensa

**SWOT** - Do inglês, *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

## I. Introdução

O farmacêutico é um profissional de saúde e especialista do medicamento sendo, desta forma, responsável pelo cumprimento de diversas tarefas inerentes à promoção da saúde e do bem-estar público, assim como funções relativas aos medicamentos e às análises clínicas.

Para que se torne num verdadeiro profissional do medicamento, é necessário que adquira vários conceitos teóricos essenciais, sendo alguns destes proporcionados através da sua formação académica, realizada ao longo de cinco anos de curso. Durante este intervalo de tempo é desafiado diariamente para a obtenção de um conhecimento técnico-científico notável, essencial para o seu crescimento académico e profissional.

O estágio curricular em farmácia comunitária é parte integrante do plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas e representa o culminar de todo o percurso académico. Este constitui uma etapa crucial na transição de estudante para farmacêutico, uma vez que somos confrontados com um ambiente de trabalho onde temos de aplicar e aprofundar todos os conhecimentos previamente adquiridos da maneira mais responsável e racional possível. É aqui que se obtém o primeiro contacto com a realidade da profissão de um farmacêutico comunitário, bem como com a comunidade e todas as suas fragilidades, consciencializando-nos acerca da responsabilidade e importância que teremos. Como futuros farmacêuticos, cabe-nos a nós saber como prestar o melhor aconselhamento possível, personalizado para cada doente, tendo plena consciência de que, enquanto profissionais de excelência, temos de nos focar no bem-estar do doente e aplicar pensamento crítico em qualquer tarefa efetuada. Para isto, é necessário que sejamos capazes de desenvolver uma capacidade de comunicação adaptada a cada pessoa, independentemente de diferenças sociais ou culturais existentes, atuando com compreensão, humanidade e com um objetivo central: melhorar o estilo de vida de cada pessoa.

O meu estágio decorreu na Farmácia Central de Cantanhede, sob orientação da Dr.<sup>a</sup> Maria João Moura, diretora técnica da farmácia, realizando um total de 810 horas compreendidas entre janeiro e abril. A escolha da farmácia foi baseada numa experiência passada durante estágio extracurricular nesta, onde pude contactar com uma equipa extremamente acolhedora e profissional e uma afluência de utentes notável.

No presente relatório apresento a minha análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), que envolve a análise dos diferentes pontos relativos à frequência do estágio, integração da aprendizagem teórica na prática profissional e à adequação do curso às perspetivas profissionais futuras<sup>(1)</sup>.

## 2. Análise SWOT

Tabela I | Análise SWOT

<b>Strenghts (Pontos Fortes)</b>	<b>Weaknesses (Pontos Fracos)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sequenciação na realização das tarefas               <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Atividades de “back-office”</i></li> <li>▪ <i>Atividades de “front-office”</i></li> <li>▪ <i>Cirurgias em animais</i></li> <li>▪ <i>Sacrifício de animais e posterior colheira de cérebros</i></li> </ul> </li> <li>• População heterogénea</li> <li>• Grande diversidade de produtos</li> <li>• Profissionais competentes, equipa dinâmica e aprendizagem rigorosa</li> <li>• Contacto com o Sifarma 2000®</li> <li>• Serviços farmacêuticos diversificados</li> <li>• Preparação de manipulados e extemporâneos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proximidade dos pontos de atendimento</li> </ul>
<b>Opportunities (Oportunidades)</b>	<b>Threats (Ameaças)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Variedade crescente de produtos no mercado e grande afluência diária de utentes</li> <li>• Existência de medicamentos não sujeitos a receita médica de dispensa exclusiva em farmácia</li> <li>• Desafios impostos por diferentes varáveis que conduzem à aprendizagem               <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Carências económicas populacionais</i></li> <li>▪ <i>Medicamentos esgotados</i></li> <li>▪ <i>Pedidos de medicamentos sujeitos a receita médica sem a apresentação da mesma</i></li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Outros postos de venda restringem os atendimentos realizados</li> <li>• Sifarma 2000®: uma perspetiva diferente do <i>software</i></li> <li>• A <i>internet</i> como fonte de autodiagnóstico</li> </ul>

### 2.1. Pontos Fortes (*Strenghts*)

#### 2.1.1. Sequenciação na realização de tarefas

Dentro de uma Farmácia, o farmacêutico é responsável por inúmeras tarefas, sendo algumas mais complexas que outras, mas todas igualmente importantes e necessárias. De modo a que seja um profissional de excelência é crucial que tenha a capacidade de executar qualquer uma destas. O contacto obtido, ao longo do estágio, com a realidade de uma Farmácia Comunitária permitiu-me ver os farmacêuticos com outro rigor, ganhando a

consciência de que este, para além de ser especialista do medicamento, deve ter boas competências no que toca à gestão e organização.

#### **2.1.1.1. Atividades de back-office**

O meu estágio na Farmácia Central de Cantanhede começou por me fornecer uma aprendizagem e contacto com as áreas de gestão e organização, antes de entrar em contacto com o público ao balcão. As atividades *back-office* são, para mim, os pilares nos quais assenta não só o atendimento ao balcão, mas também toda a sobrevivência da farmácia. Entre estas temos: a escolha adequada dos fornecedores, a realização, receção e conferência das encomendas, a marcação de preços, o armazenamento dos produtos e a realização e validação de devoluções. Em cada uma delas é necessário ter vários fatores em conta, como é o caso da realização das encomendas nas quais é importante ter uma visão ampla de todo o contexto em que a farmácia se encontra de modo a se obter uma boa gestão de *stock*, que ajudará na fidelização dos utentes e no sucesso financeiro da farmácia.

Tendo em conta a importância demonstrada de todas estas tarefas, torna-se claro que a sua execução é essencial ao longo do estágio, e só assim somos capazes de nos tornar farmacêuticos aptos a integrar o mercado de trabalho. O facto de ter iniciado o meu estágio com o aprisionamento dos produtos permitiu-me ter contacto com parte significativa destes, tendo-me familiarizado não só com nomes de marca, mas associando-os às respetivas substâncias ativas e indicações terapêuticas. Durante este processo, foi-me recomendado que analisasse as recomendações que deveriam ser feitas para cada um dos produtos, bem como que começasse a ter perceção de quais são os Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM) e quais são os Medicamentos Não sujeitos a Receita Médica (MNSRM) e, desta forma, estivesse devidamente preparada para um correto atendimento ao balcão.

#### **2.1.1.2. Atividades de front-office**

O farmacêutico constitui um agente de saúde pública que, para além de ser especialista do medicamento, precisa de ter ferramentas no que toca à comunicação com outros, garantindo assim uma relação farmacêutico-utente adequada a um correto atendimento. O meu contacto com os utentes começou pela medição de glicémia, pressão artéria e colesterol total. Esta opção foi tomada pela minha orientadora e mostrou-se fundamental no meu percurso a nível de estágio. Este pequeno passo permitiu que me adaptasse à população de uma forma mais gradual, tornando-se de extrema importância tanto para mim, no sentido em que não me dirigi imediatamente ao balcão com receio e sem saber o que esperar, como para os utentes, uma vez que conseguiram assim um atendimento mais habilitado desde o início. A

nível de atendimento, é fundamental que se seja capaz de agir naturalmente, independentemente do caso e da pessoa com que se esteja a lidar, tentando assim obter um ambiente de confiança em que não haja desconforto e/ou reticência por parte da pessoa em referir todos os pontos que serão necessários para uma boa qualidade no serviço prestado.

O farmacêutico é responsável pela transmissão de informação de forma clara e concisa, certificando-se que existe uma utilização correta dos medicamentos e outros produtos de saúde. Sendo um impulsionador de saúde e bem-estar, o atendimento deve sempre ser centralizado no utente. Durante esta fase do meu estágio fui confrontada com a responsabilidade de aplicar todos os conhecimentos que adquiri durante os anos anteriores, para ser capaz de aconselhar e esclarecer corretamente todos os pontos necessários e pedidos. O desafio auto-imposto de “saber mais” tornou-se mais importante uma vez que era crucial saber com clareza pontos-chave: interações de medicamentos, contraindicações e reações adversas. Para além disso, foi importante saber adaptar a postura, bem como a linguagem, ao tipo de pessoa com a qual estava a lidar, tendo consciência de que teria de garantir uma correta adesão ao esquema terapêutico, apesar do facto de algumas pessoas não saberem ler. A passagem para o atendimento ao balcão foi, sem dúvida, a nível pessoal, a experiência mais gratificante que obtive, sendo-me dado, por parte das pessoas, um ambiente familiar e de segurança, apesar de saberem que me encontrava ainda em fase de estágio.

### **2.1.2. População heterogénea**

Como já disse anteriormente, deverá fazer parte das competências do farmacêutico saber agir com diferentes tipos de pessoas, tendo sempre em conta de que cada uma delas tem a sua individualidade e, por isso, diferentes necessidades e cuidados. Devido à sua localização centralizada na cidade e próxima de edifícios que oferecem outro tipo de serviços, a Farmácia Central tem contacto direto com uma população heterogénea. Enquanto estagiária, esta diversidade de pessoas tornou-se extremamente pertinente, uma vez que me deu a possibilidade de enfrentar situações distintas, tanto no que toca à faixa etária, como ao modo de vida de cada utente. Estas circunstâncias poderão parecer irrelevantes, mas é importante reforçar que sendo o farmacêutico responsável por fornecer um atendimento personalizado, quanto maior a variedade de casos apresentados e de características dos utentes, mais enriquecedora será a sua experiência profissional e mais alargado será o conjunto de produtos com o qual terá hipótese de trabalhar. Tive assim possibilidade de estender o atendimento para diferentes produtos, tentando assim proporcionar um serviço individual.

### **2.1.3. Grande diversidade de produtos**

Se por um lado a existência de uma população heterogênea me permitiu trabalhar com uma maior variedade de produtos, também a existência desta última irá assumir um papel importante para a deslocação de mais utentes à farmácia, o que levou a que fosse confrontada com situações variadas e contribuiu para a minha aprendizagem. A Farmácia Central dispõe de um vasto leque de artigos de saúde, permitindo enriquecer o meu conhecimento em diversas áreas como a cosmética, homeopatia e veterinária. Os medicamentos à base de plantas e suplementos alimentares são um exemplo de produtos em ascensão, sendo fulcral o conhecimento neste domínio, uma vez que nos são feitas muitas questões relacionadas com estes e nos é exigido um aconselhamento pormenorizado. Durante o meu estágio tive a possibilidade de aplicar os conceitos que me tinham sido transmitidos por diversos professores nos anos anteriores, adquirindo progressivamente confiança no atendimento.

### **2.1.4. Profissionais competentes, equipa dinâmica e aprendizagem rigorosa**

A qualidade de uma Farmácia depende, em grande parte, dos profissionais que nela trabalham. É importante referir que este é um dos pontos que se destaca a nível de estágio em farmácia comunitária, uma vez que é através de uma aprendizagem rigorosa que se obtêm futuros farmacêuticos verdadeiramente competentes.

A Farmácia Central é dotada de uma equipa extraordinariamente dinâmica, sempre receptiva a novos projetos e desafios, cativando cada uma das pessoas que passa pelo local e mantendo a confiança de toda a população. A aprendizagem é constante, não existindo qualquer tipo de receio em assumir as suas falhas e trabalhar no sentido de que se tornem em qualidades perfeitamente adquiridas. O rigor no atendimento merece o meu destaque, uma vez que cada situação é avaliada com cuidado, averiguando-se todos os pontos essenciais para que exista um trabalho preciso, promovendo a adesão à terapêutica bem como o cumprimento de medidas não farmacológicas. É importante que o utente veja todas as suas dúvidas esclarecidas e que seja informado de potenciais efeitos secundários, modos de administração, posologia, e todas as informações que sejam necessárias para um atendimento completo, como já referenciei antes. Desta forma, permito-me dizer que me foram transmitidas práticas notavelmente importantes e minuciosas que me ajudarão a ser melhor farmacêutica.

### **2.1.5. Contacto com Sifarma 2000®**

O Sifarma 2000® é o *software* utilizado na Farmácia Central. Este constitui uma ferramenta de gestão, organização e atendimento das farmácias comunitárias que foi desenvolvido por e para farmacêuticos. O contacto com este é essencial durante a fase de adaptação para o ingresso no mundo do trabalho, uma vez que está presente na maioria das farmácias e é necessário algum tempo para se conseguir dominar esta ferramenta. As funcionalidades deste software são inúmeras, fornecendo auxílio nos processos decorrentes na farmácia, e permitindo uma maior efetividade das tarefas, bem como um aconselhamento ao utente mais personalizado e completo. É importante referir que numa fase inicial do estágio, o Sifarma 2000® facilitou a aquisição de conhecimentos acerca de diversos medicamentos, sendo um utensílio-chave para o estudo e pesquisa que eram necessários.

### **2.1.6. Serviços farmacêuticos diversificados**

A evolução das farmácias comunitárias ao longo dos anos tem sido notável, deixando de ser apenas um local de dispensa de medicamentos, para se tornar em verdadeiros espaços para promoção de saúde e bem-estar dos utentes, dotados de vários serviços farmacêuticos. A portaria nº 97/2018 de 1 de abril <sup>(2)</sup> define os serviços que são permitidos nas farmácias comunitárias, bem como os requisitos exigidos para a execução destes.

A Farmácia Central de Cantanhede dispõe de grande parte dos serviços farmacêuticos existentes, o que conduz a um papel mais ativo na população, reforçando a confiança da população. Saliento alguns dos serviços prestados: nutrição clínica (realizada por nutricionista certificada pela ordem dos nutricionistas; permite um acompanhamento personalizado, e adaptação alimentar no caso das diferentes patologias), administração de vacinas e injetáveis (realizado por farmacêuticos com curso de injetáveis certificado), consulta de revisão de medicação (realizada por farmacêutico com curso certificado; responsável por traçar um perfil farmacoterapêutico, identificando e eliminando possíveis problemas existentes derivados da medicação), dispensa semanal de medicação ( o Sistema Personalizado de Dispensa - SPD - permite o acondicionamento dos medicamentos em compartimentos individualizados e selados, facilitando o processo de toma de medicação e aumentando a adesão à terapêutica) e rastreios auditivos (mensais e gratuitos).

Por outro lado, a participação em medições de parâmetros bioquímicos também foi importante, permitindo-me um aperfeiçoamento tanto nestas técnicas, como no aconselhamento não farmacológico e acompanhamento das necessidades dos utentes, uma vez que estes serviços são responsáveis pela prevenção e controlo de algumas doenças.



### 2.1.7. Preparação de manipulados e extemporâneos

De acordo com o Decreto-Lei n.º 95/2004 de 22 de Abril, um medicamento manipulado é “qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico”<sup>(3)</sup>. A Farmácia Central de Cantanhede contém as estruturas, bem como os equipamentos necessários e exigidos para a preparação de medicamentos manipulados, cumprindo as Boas Práticas Farmacêuticas para a farmácia comunitária (BPF)<sup>(4)</sup>. São também necessários vários materiais de apoio como é o caso das Farmacopeias e outros documentos oficiais. É importante ter-se em conta que o Formulário Galénico Português (2007) não contém as monografias para todas as fórmulas e, nesse caso, terá de se contactar o LEF (Laboratório de Estudos Farmacêuticos - departamento da ANF), que envia a técnica e os materiais de apoio necessários para a realização da monografia. Os medicamentos manipulados constituem terapêuticas mais personalizadas, adaptando-se tanto a forma farmacêutica como a dosagem ao utente em questão, e às necessidades específicas que poderão não ser satisfeitas com o recurso a medicamentos existentes no mercado. Estes medicamentos são prescritos através de uma receita médica, tendo na sua designação “F.S.A” (Faça Segundo Arte) ou “Medicamento Manipulado”, indicando igualmente a dose, forma farmacêutica, posologia e via de administração.

Um exemplo de manipulado que tive a oportunidade preparar foi a *Pomada de Enxofre a 6%*. Esta foi prescrita (Anexo 1) para o tratamento da Sarna, que constitui uma infeção cutânea provocada pelo parasita *Sarcoptes scabiei var. hominis*. Os principais sintomas são a existência de prurido intenso com padrão de distribuição das erupções característico. O Enxofre é utilizado há séculos como escabicida, tendo uma baixa toxicidade<sup>(5)</sup>. Neste caso, não existe ficha de preparação no Formulário Galénico nem na Farmacopeia, pelo que se recorreu ao Laboratório de Estudos Farmacêuticos para se conseguir proceder à realização da mesma (Anexo 2). É também necessário consultar a ficha de segurança da matéria-prima e, paralelamente, confirmar a segurança do medicamento (tendo em conta a dosagem e as substâncias ativas) e certificar-se que não existam interações que possam interferir com a saúde do utente ou com as ações do próprio medicamento.

Após a preparação do manipulado, comecei por rotular devidamente a caixa (Anexo 3). Por fim, procedi ao preenchimento das Fichas de Preparação do Medicamento Manipulado e ao cálculo do preço de venda ao público (Anexo 4), que é realizado através do valor dos honorários de preparação, das matérias-primas e do material de embalagem<sup>(6)</sup>.

Durante o estágio tive também oportunidade de realizar preparações extemporâneas de antibióticos, que, sendo formas farmacêuticas instáveis, têm de ser reconstituídas no ato da dispensa.

A realização de todos estes casos é, na minha opinião, um ponto essencial durante o estágio, tendo entrado em contacto com todos os passos necessários. Desta forma, foi-me fornecida a oportunidade de ganhar experiência para o futuro, adquirindo a consciência acerca da importância de se ter conhecimentos alargados e rigor ao longo de todos os procedimentos.

## **2.2. Pontos Fracos (*Weaknesses*)**

### **2.2.1. Proximidade dos pontos de atendimento**

A farmácia é um espaço em que o utente precisa de se sentir totalmente à vontade, de modo a que transmita ao farmacêutico todas as informações necessárias para um atendimento correto. A importância de uma confiança completa poderá parecer mínima, no entanto, é dela que irá depender a indicação farmacêutica disponibilizada, e, desta forma, o bem-estar final da população. Esta posição de conforto, como já o disse atrás, depende em grande parte da atitude presente no farmacêutico, no entanto, existem outras condicionantes que fazem a diferença.

Durante o meu estágio na Farmácia Central, percebi que um dos pontos que fragilizavam o atendimento era a proximidade dos pontos de atendimento. Fui confrontada muitas vezes com o desafio de conseguir toda a informação que precisava, tendo os utentes do balcão ao lado a interromper este processo ao espreitarem ou comentarem, o que constituía um problema para manter a privacidade da pessoa que eu estava a atender.

## **2.3. Oportunidades (*Opportunities*)**

### **2.3.1. Variedade crescente de produtos no mercado e grande afluência diária de utentes**

A existência de uma grande variedade de produtos no mercado e na Farmácia em si já foi referido como ponto forte do estágio em farmácia comunitária. O aumento quase exponencial desta variedade, por sua vez, constitui uma oportunidade para o mesmo. É importante que esta etapa seja vista como um processo de aprendizagem e, desta forma, todas as situações que sejam um incentivo para a aquisição de novos conhecimentos deverão ser vistas como uma oportunidade a nível de estágio.

Com esta expansão do mercado farmacêutico, somos postos em contacto com produtos variados que antes não conhecíamos, ou, mesmo conhecendo, não teríamos aprofundado, por exemplo, as suas indicações e possíveis efeitos secundários. Assim, a entrada de novos fármacos ou até novas gamas de cosmética na farmácia potenciou o meu processo de aprendizagem e, conseqüentemente, o meu estágio em farmácia comunitária. Em paralelo com este ponto, encontramos o facto de existirem outras superfícies comerciais à volta da farmácia, o que permite uma grande afluência à mesma. Encontra-se uma relação quase direta entre o contacto com vários produtos e uma grande variedade de pessoas, uma vez que nos são muitas vezes solicitados produtos que não conhecemos e que, a partir daí, passamos a reconhecer.

### **2.3.2. Existência de medicamentos não sujeitos a receita médica de dispensa exclusiva em farmácia**

A existência de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica de dispensa Exclusiva em Farmácia (MNSRM-EF) são uma oportunidade para qualquer estágio na área de farmácia comunitária. Como o nome indica, tratam-se de medicamentos que, apesar de não serem sujeitos a receita médica, podem apenas ser dispensados em Farmácias. Apesar de ainda serem relativamente poucos, os MNSRM-EF encontram-se devidamente regulamentados e listados por Denominação Comum Internacional (DCI) pelo INFARMED.

A existência desta definição e desta restrição a nível de venda é uma oportunidade para o estágio, na medida em que o número de pessoas que se desloca à farmácia será aumentado, uma vez que não terão outros locais como opção que não as farmácias. Por outro lado, permite-nos mostrar o nosso potencial a nível de profissionais da área farmacêutica. Assim, permitiu-me transmitir informações importantes durante o atendimento que não seriam dadas em mais nenhum local e, assim, obter a confiança da população, bem como diminuindo os potenciais riscos associados à medicação.

### **2.3.3. Desafios impostos por diferentes variáveis que conduzem à aprendizagem**

Existem diversas situações que ocorrem no quotidiano das farmácias comunitárias que poderão ser confundidas com ameaças, apesar de, quando analisadas com mais rigor, se caracterizam como oportunidade a nível de estágio curricular. Sendo este uma fase de aprendizagem intensiva, é importante ter em conta que, todo e qualquer desafio, com maior ou menor exigência psicológica e/ou física, serve de primeiro contacto para que, no futuro, enquanto farmacêuticos, estejamos preparados a enfrentar qualquer um destes de forma mais consciente. Neste sentido, apresento alguns dos problemas que ocorreram durante o meu

estágio e que estão inseridos nos desafios em questão, nomeadamente as carências económicas populacionais, a existência diária de medicamentos esgotados e o pedido de medicamentos sujeitos a receita médica sem que esta fosse apresentada.

### **2.3.3.1. Carências económicas populacionais**

Um dos principais problemas populacionais trata-se de uma grande carência económica. Apesar de se registarem, até 2017, percentagens decrescentes de desempregados em Cantanhede, durante o estágio fui confrontada com um vasto grupo de pessoas carenciadas, os quais, apesar das indicações que lhe dava, rejeitavam a hipótese de adquirir certos produtos. É frequente ver este cenário a nível de farmácia, sendo agravado pela alteração constante nos preços dos medicamentos, uma vez que causa desconforto ao utente e reticência na aquisição dos mesmos. Estas circunstâncias permitiram-me perceber como agir em algumas destas situações, tendo de adaptar as indicações ao poder económico do utente que estava a atender.

### **2.3.3.2. Medicamentos esgotados**

Um dos principais problemas vividos em farmácia comunitária é a existência de produtos esgotados. Neste caso, torna-se fundamental termos a capacidade de nos colocar na posição do utente, tendo sempre em conta que a maioria não terá conhecimento de como tudo acontece dentro de uma farmácia. Assim, é frequente que surja uma incompreensão por parte destes e, além de mostrarem descontentamento pelo facto de não terem os seus medicamentos quando necessitam, poderão culpar a farmácia ou os farmacêuticos presentes pela situação. Durante o estágio contactei várias vezes com este contratempo, percebendo que deveria sempre ser compreensiva e tentar o máximo que pudesse acalmar as pessoas e resolver a situação da melhor maneira possível. Uma vez que se tratam de situações das farmácias em geral, como futura farmacêutica torna-se fulcral saber como encarar este desafio, sem comprometer os atendimentos e o bem-estar dos utentes.

### **2.3.3.3. Pedidos de medicamentos sujeitos a receita médica sem a apresentação da mesma**

Um fator externo que por vezes representa um desafio e, conseqüentemente, uma oportunidade de aprendizagem a nível de estágio, são os próprios utentes. Cada pessoa tem as suas bases sociais bem como o seu grau de aceitação em relação a algumas das regras que devem ser estabelecidas. Posto isto, foi frequente durante o meu estágio o pedido de MSRM sem a existência de uma prescrição para os mesmos. O descontentamento de algumas pessoas

era notório e exposto perante outros utentes. A relevância destas situações é acentuada a nível de perda a nível de fidelização de utentes que, por vezes, não aceitam o facto de não lhes cedermos certos medicamentos. É importante aqui realçar o papel das fontes de informação pouco fidedignas, como é o caso da *internet*, que, muitas vezes, põe como hipóteses de tratamento medicamentos que estão incluídos neste conjunto. Por fim, outro fator responsável é o “boca-a-boca”, uma vez que existiam inúmeros utentes que se justificavam com expressões idênticas a “um colega meu falou que com ele resultou!”. Como tentativa de ultrapassar estas situações, tentei sempre responder a todas as dúvidas que me eram dirigidas, bem como explicar os riscos que poderiam estar associados à utilização destes medicamentos sem prévio diagnóstico do médico.

## **2.4. Ameaças (*Threats*)**

### **2.4.1. Outros postos de venda restringem os atendimentos realizados**

Segundo o Decreto-Lei nº134 de Agosto de 2005<sup>(7)</sup>, passou a ser possível a comercialização de MNSRM fora das farmácias. A existência de outros postos de venda de MNSRM, que não as farmácias, tem-se tornado numa das alternativas dos utentes para a aquisição destes produtos. A ampla distribuição dos estabelecimentos, adequada ao deslocamento do utente, bem como os preços extremamente competitivos têm sido das razões mais presentes para que a população deixe de frequentar as farmácias. A nível de bem-estar populacional, a principal ameaça é o facto de estes locais facilitarem a automedicação e, desta forma, as interações e possíveis efeitos indesejados que poderão comprometer a saúde do utente. Assim, é importante que, enquanto especialistas do medicamento, mostremos o valor real do nosso atendimento, tendo como principal foco a manutenção de uma correta utilização dos medicamentos. A nível de estágio curricular, estes postos de venda constituíram uma ameaça, uma vez que diminuem a afluência à farmácia e, desta forma, a oportunidade de aprendizagem que teria origem nos diferentes atendimentos.

### **2.4.2. Sifarma 2000®: uma perspetiva diferente do *software***

A existência de um *software* que contém diversas funcionalidades de apoio constitui, sem dúvida, um ponto forte de qualquer farmácia onde este esteja presente. No entanto, também este constitui uma ameaça em diversas situações. Como estagiária que teve a possibilidade de contactar com este *software*, fui confrontada com situações mais difíceis, nomeadamente a nível da existência de erros nas posologias indicadas. Por outro lado, a complexidade, bem como algumas falhas durante o atendimento e na realização de outras

funções, foram um dos obstáculos que encontrei a nível de execução de algumas tarefas no estágio.

### **2.4.3. A internet como fonte de autodiagnóstico**

Vivemos numa sociedade cada vez mais dependente das tecnologias, sendo a internet uma ferramenta indispensável para praticamente toda a população. Os inúmeros benefícios relacionados com esta são impossíveis de listar, no entanto, também apresenta pontos negativos. O excesso de informação constitui um problema de grande escala, uma vez que qualquer pessoa poderá publicar acerca de todos os temas que desejar, sendo ou não profissional na área em questão. Desta forma, a população acaba por ler falsas informações, retendo-as como se fossem verdadeiras. Esta realidade tem-se mostrado bastante presente na farmácia.

O recurso à *internet* para obter diagnósticos ou até “indicações farmacêuticas virtuais” é uma ameaça de grande escala. Durante o estágio somos confrontados com utentes que nos pedem inúmeros produtos que nunca utilizaram antes e que, na verdade, não sabem quais os riscos associados, por terem lido na *internet* que poderia resolver os seus problemas. Muitas vezes torna-se quase impossível tentar dar uma opinião profissional e persuadir a fazerem um tratamento diferente, pois confiam de olhos fechados na informação que obtiveram antes.

## **3. Casos Práticos**

### **3.1. Dermatite de contacto**

Utente do sexo masculino, com aproximadamente 30 anos dirigiu-se à farmácia para obter aconselhamento uma vez que tinha trabalhado com cimento dois dias antes, tendo este entrado em contacto com a pele que este tinha exposta no momento (braços e pernas). A substância em questão não foi imediatamente retirada, tendo ficado em contacto com a pele todo o dia. Após retirar o cimento começou a sentir bastante prurido (especialmente à noite), tendo aparecido no dia a seguir bastantes “bolhinhas com líquido transparente”. Tendo em conta a descrição dada, perguntei ao utente se não se importaria de me mostrar um braço para que eu pudesse analisar mais profundamente a situação. Verifiquei que já não tinha as “bolhinhas” que descrevia, mas que a pele se apresentava bastante avermelhada e com feridas notáveis, no entanto, não apresentava inflamação. Optei por fazer algumas perguntas para tentar perceber o aspeto do líquido em questão, às quais obtive a descrição “eram tipo água peganhenta”. Além disso, constatei que já não estavam presentes uma vez que as teria rebentado devido ao prurido. A indicação que fiz foi constituída por três produtos:

1) *Gel de limpeza LIPIKAR Syndet*<sup>®</sup> - trata-se de um gel de limpeza de corpo indicado para pele sensível, irritada e com prurido. Indiquei-lhe este produto para evitar a utilização de outro gel de banho ou sabão que pudesse irritar a pele e piorar a reação alérgica.

2) *Cicabio*<sup>®</sup> em loção - gama da Bioderma utilizada para reparação epidérmica, atuando em todas as fases de cicatrização (resveratrol, centelha asiática, ácido hialurónico e zinco), sendo indicada para ajudar na reparação das feridas apresentadas. Também tem uma ação “anti-dor” e anti-prurido (devido à quitorfina), que iria ajudar no controlo da comichão que o senhor apresentava. Indiquei a loção uma vez que tem um elevado poder secante, sendo o indicado para lesões exsudativas.

3) *Cetix*<sup>®</sup> - anti-histamínico oral de segunda geração não sujeito a receita médica (os anti-histamínicos de segunda geração provocam menos sonolência do que os de primeira geração). Os anti-histamínicos orais são contra-indicados em epilepsia, hipertrofia prostática, obstipação, glaucoma e retenção urinária, pelo que tive de me assegurar que o senhor não tinha nenhuma destas situações clínicas. Por outro lado, o senhor não tomava qualquer tipo de medicação adicional, pelo que não iria ter possíveis interações. Apesar dos anti-histamínicos de segunda geração provocarem menos sonolência do que os de primeira geração, recomenda-se sempre a sua toma preferencialmente à noite, precavendo possíveis casos de sonolência.

Por fim, aconselhei a evitar o contacto com o agente que provocou a reação (neste caso, o cimento) e indiquei que, ao secar a região com a toalha, não esfregasse, mas sim efetuasse toques suaves. Mostrei também que era importante que evitasse coçar e que mantivesse as unhas cortadas, de modo a não provocar mais lesões.

### **3.2. Picada de inseto**

Senhora de aproximadamente 50 anos dirigiu-se à farmácia e queixou-se que tinha sido picada por um inseto que não sabia ao certo qual teria sido. Refere que pôs Fenistil Gel<sup>®</sup> (Dimetindeno) mas que não resultou até ao momento. Acrescenta também que tem “uma espécie de caroço” que se foi formando e que lhe tem provocado alguma dor. Numa primeira abordagem perguntei-lhe qual foi a localização da picada e se exista mais algum tipo de sintoma, ao qual me responde que foi numa área exposta da perna e que não sente nada a não ser a dor no local. De modo a fazer um aconselhamento acertado, tentei obter informação acerca da medicação que poderia estar a tomar, ficando a saber que tomava Varfarina diariamente. A primeira opção de tratamento que pensei foi Ibuprofeno 400mg (de 8 em 8 horas), para o alívio das dores e Pandermil<sup>®</sup> (hidrocortisona tópica) de modo a diminuir a inflamação. No

entanto, tendo em conta que a senhora em questão estava a tomar a Varfarina, e sabendo a sua interação com o ibuprofeno (Anexo 5), decidi não dispensar este último. Aconselhei então que aplicasse Pandermil® (hidrocortisona) uma vez que, ao atuar na inflamação, diminuirá a dor. Além disso, devido à presença de uma inflamação acentuada contendo alguma rigidez, dispensei igualmente Fucidine® (ácido fusídico), tendo em conta que se trata de uma situação indicativa de infeção secundária à picada.

Ao dispensar a hidrocortisona informei a senhora de que a duração máxima do tratamento seria de 7 dias e, caso não obtivesse melhorias, deveria consultar o médico. Acrescentei ainda que não deveria expor a zona afetada ao sol após a aplicação e que deveria utilizar sempre protetor solar.

Em termos de aconselhamento não farmacológico, recomendei que quando sentisse maior inflamação que aplicasse compressas de água fria ou gelo na zona afetada uma vez que iria ajudar a reduzir o edema. Também mostrei a importância que teria, no caso de surgir algum prurido, de evitar coçar uma vez que poderia provocar lesões com as unhas (Anexo 6).



#### 4. Conclusão

Uma farmácia comunitária é, como o nome indica, um local para a comunidade, em que todos os pontos são pensados com o mesmo objetivo: o bem-estar do utente. Trata-se de uma área das ciências farmacêuticas desafiante de dia para dia, tendo de existir uma mente completamente aberta a novas etapas e estratégias, uma vez que toda a sociedade vai mudando e a Farmácia necessita de se adaptar a estas mudanças.

Durante o meu estágio, tive oportunidade de aprender com profissionais de excelência, pessoas dinâmicas e que, mesmo tendo uma capacidade autónoma incrível, são capazes de se unir enquanto equipa para que tudo seja concluído com o maior rigor possível. Acredito firmemente que a aprendizagem não depende apenas dos nossos esforços e convicções, mas também das pessoas que nos transmitem todo o conhecimento. Fui recebida por todos os profissionais da equipa com carinho, tendo-me ajudado a dar mais uns passos na direção da carreira farmacêutica.

Na Farmácia Central de Cantanhede, juntamente com a equipa, percebi que o farmacêutico é multicompetente, adaptando-se às diferentes situações e ambientes. A competência que esta profissão exige é de grande dimensão e fascinante, tendo de se aperfeiçoar não só como especialista do medicamento, mas também noutras áreas, como é o caso da economia e gestão. Além disso, a capacidade de comunicação é um ponto essencial para a inserção na comunidade e para um trabalho completo e rigoroso.

A nível de aprendizagem, o estágio em farmácia comunitária mostrou ser crucial para o fim desta etapa e início de uma nova. Foram-me dadas, diariamente, oportunidades para superar desafios e aplicar os conhecimentos assimilados durante os anos anteriores, bem como para a aquisição de novos. O contacto com a realidade profissional é essencial para a preparação enquanto futuros farmacêuticos e deve ser aproveitado com o máximo de esforço e dedicação.

Concluo este relatório satisfeita com o percurso que tive o prazer de percorrer e ciente de que esta experiência me fez crescer enquanto futura farmacêutica, adquirindo consciência que me esforçarei para cumprir o Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos com enorme orgulho e responsabilidade<sup>(8)</sup>.

## 5. Referências Bibliográficas

- 1 - FFUC, Normas Orientadoras do Estágio Curricular 2015/2016; Acedido a 12 de maio de 2019.
- 2 - PORTARIA nº 97/2018 de 9 de abril. *Diário da República nº 69/2018 - 1ª Série. Saúde.*
- 3 - DECRETO-LEI nº 95/2004 de 22 de Abril. *Diário da República – 1 Série A. Ministério da Saúde.*
- 4 - ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Boas Práticas Farmacêuticas para a Farmácia Comunitária**. 3ª edição. OF: Conselho Nacional da Qualidade, 2009. [Acedido a 12 de maio de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/>
- 5 - SANTIAGO, F; JANUÁRIO, G. - **Escabiose: revisão e foco na realidade portuguesa**. *Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology*. 75,2 (2017).
- 6 - DECRETO-LEI nº 769/2004 de 1 de Julho. *Diário da República – 1 Série-B. Ministérios da Economia e da Saúde.*
- 7 - DECRETO-LEI nº 134/2005 de 16 de Agosto. *Diário de República – 1 Série-A. Ministério da Saúde. Lisboa.*
- 8 - ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Código Deontológico** [Acedido a 20 de maio de 2019] Disponível na Internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/>

## 6. Anexos

### Anexo I | Receita Eletrónica do Manipulado “Pomada de Enxofre 6%”

REPÚBLICA PORTUGUESA  
SNS

Guia de tratamento da prescrição n.º [REDACTED]  
Data: 2019-03-12



**Guia de Tratamento para o Utente**  
Não deixe este documento na Farmácia

Utente: [REDACTED]  
Local de Prescrição: [REDACTED]  
Prescritor: [REDACTED]  
Telefone: [REDACTED]  
Código de Acesso e Dispensa: [REDACTED]  
Código de Opção: [REDACTED]

	Quantidade	Intervento de prescrição	Exigência
1	1	Manipulado de enxofre a 6% - enxofre 6g + vaselina pomada 94g - 100g (A.A.) Aplicar 2 dias seguidos, 12 dias de intervalo - aplicar novamente 2 dias. Levantar roupa a 50°	2019-03-14
2	1	Eloestira, 20 mg, Comprimido revestido por película, Biotin - 20 unidades 1 cp por dia	2019-03-14 Esta prescrição constitui, no máximo, € 6,30, a não ser que seja por um medicamento mais caro

\*Os preços são válidos à data de prescrição. Para verificar se houve alterações nos preços dos medicamentos:  
- Consulte o Preço de Medicamentos em [www.informad.pt](http://www.informad.pt) ou a Pádua na Farmácia ou ao Médico;  
- Contacte a Linha de Medicamentos 800 222 444 (Das 08h às 14h e 14h às 17h30);  
- Fale com o seu médico ou farmacêutico.

Códigos para utilização pela farmácia em caso de falência do sistema informático

1  2 

Pág. 1 de 1

## Anexo 2 | Ficha de Preparação semi-preenchida do Manipulado “Pomada de Enxofre 6%”

Farmácia Central  
Carnaxide

**FICHA DE PREPARAÇÃO**  
**POMADA DE ENXOFRE A 6%**

Forma farmacéutica: pomada propriamente dita (pomada hidrófoba) Data de preparação: 15-02-2019  
Número de Lote: 02/2019/5 Quantidade a preparar: 100g

Material primos	Nº Lote	Origem	Farmacopéi- a	Quantidade para 100g	Quantidade consultada (g ou ml)	Quantidade prezada	Rubrica Operador e Data	Rubrica Supervisor e Data
Enxofre precipitado	0114-2019	Frogman	—	6g	6g	6,00g		
Vaselina líquida	001/101/7	Wolulab	—	7,04g	7,04g	7,04g		
Vaselina branca	000-013190	gama	—	91,96g	91,96g	92,00g		

Material de Embalagem: 250ml/0,113 Opusculo Opusculo Opusculo

Material de Embalagem	Nº Lote	Origem

Nome Doente: Maria Helena Maia da Fonseca  
Nome Prescritor: Maria Clara Costa

Preparação:	Rubrica Operador e Data	Rubrica Supervisor e Data
1. Limpar a placa e espátula e a estátula com álcool a 70%.		
2. Preparar o papel de pesagem - fazer 4 sinco para não se perder produto pesado.		
3. Colocar papel de pesagem na balança analítica e tarar.		
4. Pesar <u>6g</u> de enxofre para o papel de pesagem.		
5. Colocar na placa de espátula.		
6. Pesar o papel de pesagem. A diferença tem de ser <u>± 0,1%</u> ( <u>7,04g - 6,93g = 0,11g</u> )		
7. Pesar <u>7,04g</u> de vaselina líquida na balança analítica.		
8. Pesar <u>91,96g</u> de vaselina branca na balança analítica.		
9. Incorporar aos poucos o enxofre na vaselina líquida por espátulação.		
10. Incorporar, por espátulação, a mistura em porções homogêneas de vaselina branca.		
11. Espátular até obtenção de pomada de coloração amarela homogênea.		
12. Proceder ao controlo de qualidade.		
13. Embalar e rotular.		
14. Anexar a esta ficha de preparação uma cópia assinada e carimbada do rótulo da embalagem dispensada.		

**Controlo de Qualidade:**

Ensaio	Especificação	Resultado		Rubrica Operador
		Conforme	Não Conforme	
1. Características Organolépticas	Cor pomada de cor amarela	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Odor sulfuroso	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Aspecto homogêneo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
2. Conformidade com a definição da monografia "preparações semi-sólidas cutâneas" da FP IX	Texto "Preparações semi-sólidas cutâneas" pag. 912, 1ª Volume, FP IX	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
3. Quantidade	Tarar previamente o recipiente de dispensa e, em seguida, pesar o recipiente com o respectivo conteúdo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	<u>92,96g</u> (± 5%)			

Aprovado:  Rejeitado:

Supervisor:  Data:

Rubrica do Director Técnico:

**Anexo 3 | Caixa Rotulada do Manipulado “Pomada de Enxofre 6%”**





## Anexo 5 | Interação entre o Ibuprofeno e a Varfarina

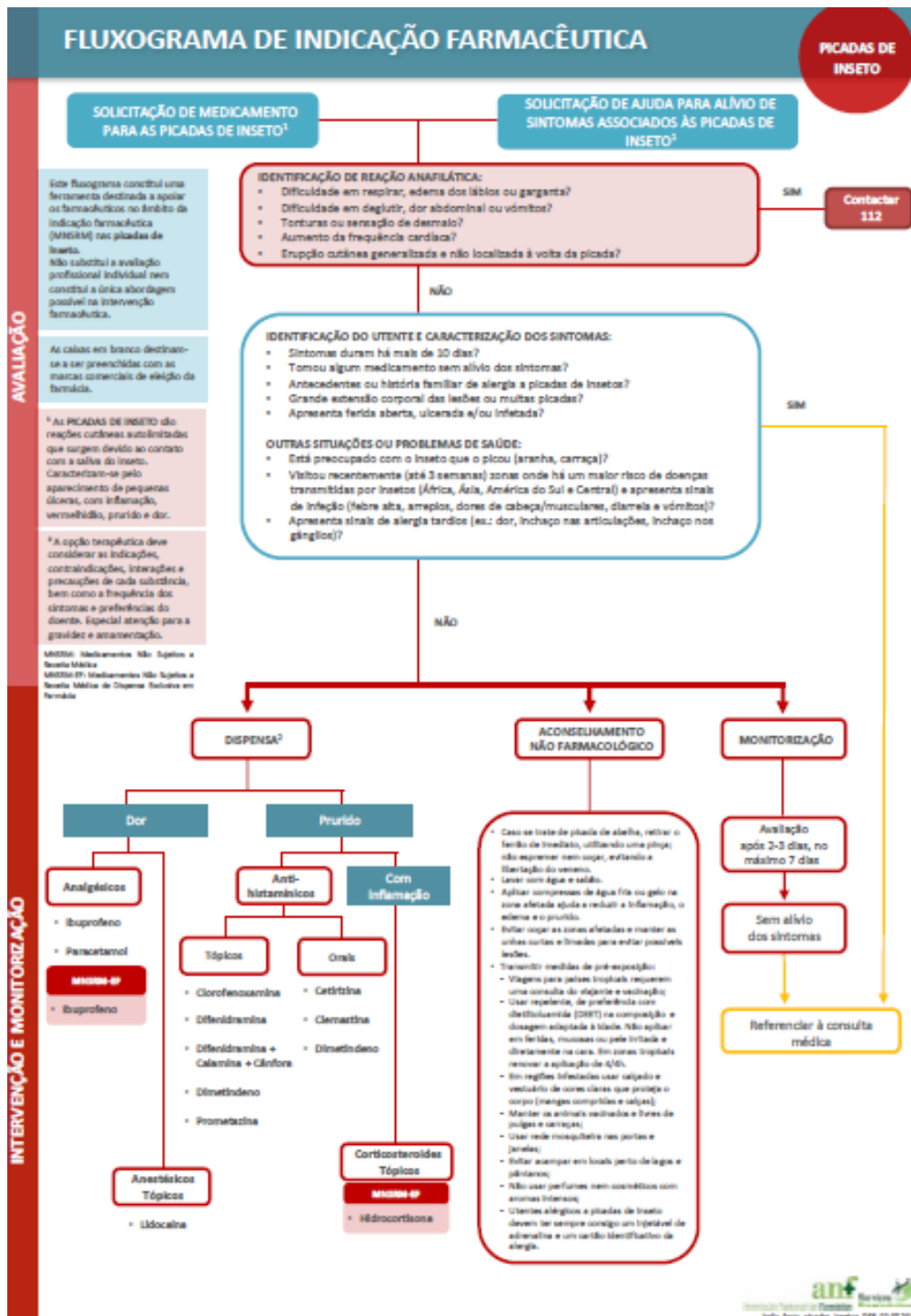
### Interactions between your drugs

**Major** **ibuprofen <> warfarin**

Applies to: ibuprofen, warfarin

GENERALLY AVOID: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) may potentiate the hypoprothrombinemic effect and bleeding risk associated with oral anticoagulants. In a one-year observational study of a population of coumarin users, the relative risk of bleeding complications due to concomitant NSAID use was 5.8 compared to coumarin use alone. Some investigators suggest that the risk of hemorrhagic peptic ulcers in particular may be substantially increased, especially in elderly or debilitated patients. A retrospective epidemiologic study of patients aged 65 years or older reported a nearly 13-fold increase in the risk of developing hemorrhagic peptic ulcer disease in concurrent users of oral anticoagulants and NSAIDs compared with nonusers of either drug. Fatalities have been reported. The pharmacologic effects of NSAIDs that contribute to this interaction include gastrointestinal irritation, prolongation of prothrombin time, and inhibition of platelet adhesion and aggregation. In addition, various NSAIDs have also been shown to alter the pharmacokinetics of warfarin and other oral anticoagulants, resulting in increased INR or prothrombin time. However, some studies failed to demonstrate any evidence of an interaction.

# Anexo 6 | Fluxograma de Indicação Farmacêutica de “Picada do Inseto” (ANF)





# PARTE II

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM  
INVESTIGAÇÃO CIENTÍFICA

## I. Introdução

A investigação científica é uma área com importância global, tendo impacto nas diversas áreas do saber, particularmente na prática farmacêutica. Sendo o farmacêutico um especialista do medicamento, é crucial o seu envolvimento e interesse em todas as etapas envolvidas desde a descoberta até à dispensa deste. Para isso, é necessário que esteja presente nos vários grupos de investigação, aplicando os seus conhecimentos e as suas qualidades, essenciais para qualquer uma das equipas em questão. Além disso, tendo em conta as capacidades adquiridas por estes profissionais ao longo do percurso académico, sendo estes dotados de um raciocínio crítico e perspicácia nas tarefas realizadas, são uma mais valia nas diversas áreas de investigação. Neste sentido, é importante que os farmacêuticos tenham a perceção da complexidade existente, ganhando consciência do quanto este ramo influencia o resto das suas atividades, bem como o bem-estar da população, no geral.

Desta forma, apesar do estágio na área de investigação científica não ser de carácter obrigatório, a realização deste consiste num desafio e numa oportunidade importante do percurso académico, possibilitando o contacto com profissionais de excelência, bem como de técnicas e procedimentos extremamente rigorosos, o que permite a aquisição de uma visão mais concreta.

O meu estágio em investigação decorreu Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC), sob orientação do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida e supervisão de Dina Pereira, estudante de doutoramento no grupo em questão. O estágio teve uma duração total de três meses, compreendidos entre maio e agosto. A escolha do grupo de investigação baseou-se no interesse adquirido pela doença de Machado-Joseph durante o meu percurso académico, uma vez que representa uma doença neurodegenerativa com implicações significativas na vida daqueles que vivem com ela e para a qual ainda não existem opções preventivas nem terapêutica para o seu tratamento <sup>(1)</sup>.

Com este relatório apresento a minha análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*) acerca da frequência no estágio em investigação científica, contendo uma análise crítica da experiência relativa à frequência de estágio, integração da aprendizagem teórica na prática profissional e à adequação do curso às perspetivas profissionais futuras <sup>(2)</sup>.

## 2. Análise SWOT

Tabela I | Análise SWOT

<b>Strenghts (Pontos Fortes)</b>	<b>Weaknesses (Pontos Fracos)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Observação de diversos procedimentos que envolvem a utilização de animais de laboratório:               <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Testes de comportamento animal</i></li> <li>▪ <i>Análise dos resultados obtidos nos testes de comportamento animal</i></li> <li>▪ <i>Cirurgias em animais</i></li> <li>▪ <i>Sacrifício de animais e posterior colheita de cérebros</i></li> </ul> </li> <li>• Observação de cortes de cérebros</li> <li>• Execução de imuno-histoquímica no visível</li> <li>• Extração de DNA plasmídico de bactérias</li> <li>• Extração de RNA e proteína pelo método de trizol</li> <li>• Equipamento variado</li> <li>• Realização de uma formação de sala de culturas.</li> <li>• Rotatividade das atividades</li> <li>• Equipa dinâmica e de excelência</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Impossibilidade de contacto com alguns equipamentos devido à sua ausência</li> </ul>
<b>Opportunities (Oportunidades)</b>	<b>Threats (Ameaças)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facilidade na procura e troca de informação científica</li> <li>• Horários flexíveis dos profissionais</li> <li>• Restrição da informação autorizada a transmitir</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não ter o curso de experimentação animal</li> </ul>

### 2.1. Pontos Fortes (Strenghts)

#### 2.1.1. Observação de diversos procedimentos que envolvem a utilização de animais de laboratório

A utilização de animais para meios científicos encontra-se regulamentada por diversos decretos de lei, nomeadamente o Decreto de Lei nº 1/2019, de 10 de janeiro, que procede à primeira alteração do Decreto de Lei nº 113/2013, de 7 de agosto (relativo à proteção dos animais utilizados para fins científicos).<sup>(3)(4)</sup> Neste, é estabelecido o princípio dos “3R”: *Replacement* (Substituição: sempre que possível, utilizar meios sem sensibilidade, ao invés de animais vivos), *Reduction* (Redução: Sendo necessária a utilização de animais, o número destes

deverá ser o menos possível, desde que forneça resultados estatisticamente significativos) e *Refinement* (Aprimoramento: utilização de técnicas menos invasivas realizadas apenas por pessoas treinadas).<sup>(3)</sup>

Apesar de bastante controversa, esta é uma vertente crucial para o estudo de diversas doenças, nomeadamente a de *Machado-Joseph*, uma vez que permite adquirir conhecimentos que mais nenhum modelo (que não o animal), até aos dias de hoje, permitiu. A escolha dos animais depende das propriedades dos mesmos, bem como das diferentes variáveis entre estudos. Ao longo do meu estágio tive oportunidade de contactar com murganhos (*mus musculus*) da linhagem C57BL/6, assistindo à sua manipulação para testes comportamentais e cirurgias, como irei referir mais detalhadamente nos próximos pontos. A utilização de murganhos ao invés de outros animais tem vantagens significativas, como é o caso da facilidade do seu manuseamento e das condições necessárias para a sua manutenção. Por outro lado, estes reproduzem-se rapidamente e têm um tempo de vida relativamente curto, permitindo a observação de diversas gerações em períodos de tempo reduzidos. Por fim, os conhecimentos existentes acerca da anatomia, fisiologia e até genética dos murganhos são já bastante significativos, o que proporciona um maior entendimento dos seus comportamentos e das alterações que ocorrem durante os estudos. É também a partir de todos estes dados existentes sobre os vários aspetos desta espécie que se consegue analisar o seu bem-estar (fator determinante na capacidade de adaptação a novos ambientes), crucial para a obtenção de melhores resultados. Além disso, também pude observar a diferença de comportamento nos animais, de acordo com a atitude e conduta do indivíduo que os está a manipular: um estado emocional com mais stress interfere com a calma dos murganhos, influenciando o seu foco no desenvolver das diferentes atividades a serem realizadas.

#### **2.1.1.1. Testes de comportamento animal**

Para o estudo de doenças neurodegenerativas em modelos animais, como é o caso da de *Machado-Joseph*, a utilização de testes comportamentais é imperativa, na medida que possibilita a análise do fenótipo e, desta forma, a progressão da doença ou eficácia do tratamento administrado. Assim, dependendo da vertente fenotípica que se pretende acompanhar, são escolhidos diferentes testes <sup>(5)</sup>. Para a realização destes, é importante que cada um dos murganhos se encontre devidamente marcado para que se consigam identificar individualmente e, desta forma, não se corra o risco de os confundir e trocar resultados. Esta marcação pode ser temporária (utilizando caneta ou o corte do pêlo) ou permanente (recorrendo a brincos numerados, furador, corte com tesoura, tatuagem ou marcação

eletrónica com micro-*chip*), sendo que, durante o estágio, pude observar as que recorrem a caneta e/ou brincos numerados.

Após a marcação em questão, a realização dos testes de comportamento fica facilitada, diminuindo o risco de erros e gerindo o tempo existente com mais eficácia. O estágio permitiu-me o contacto com quatro destes testes:

- i. RotaRod: teste utilizado para análise da coordenação motora e do equilíbrio que consiste numa barra posicionada horizontalmente, com a capacidade de rodar a velocidade constante ou acelerada. O murganho é colocado em cima desta e é analisada a sua tendência para cair. Dependendo do modo de velocidade utilizado, este teste pode dividir-se em dois tipos: estacionário e acelerado. Em ambos os casos, é medido o tempo que o murganho consegue permanecer em cima do cilindro (máximo de cinco minutos) sendo que, no acelerado, deve igualmente ser indicada a velocidade máxima atingida. São efetuados vários *trials*, exigindo-se um intervalo mínimo de quinze minutos entre cada um deles, crucial para assegurar o descanso apropriado de cada animal. O modo acelerado é caracterizado por ser mais rápido a realizar e mais eficiente, contudo, é mais provável que neste se confundam problemas de coordenação motora com cansaço. Apesar do *rotarod* ser o teste de comportamento mais utilizado em murganhos para avaliar a coordenação motora, é de notar que também neste se encontram alguns problemas, como é o caso da desistência dos animais após perceberem que a queda sofrida é completamente inofensiva. Este é um caso que, apesar de não ser muito recorrente, poderá acontecer.<sup>(5)</sup>
- ii. Beam walking: para a realização deste teste, é utilizada uma vara em altura, sendo colocado, numa das extremidades, o murganho, e, na outra, uma plataforma segura. O objetivo deste teste é a avaliação do equilíbrio, uma vez que é medido o tempo dispensado para atravessar a vara de uma extremidade à outra. No estudo que presenciei foram utilizadas varas de diferentes formas (prisma quadrangular ou cilindro) e dimensões/diâmetros (prisma quadrangular – 9mm; cilindro – 9 e 6mm de diâmetro). Um dos fatores que se manifestou mais preocupante durante a execução do teste das varas em altura foi o *stress* verificado em alguns dos animais, que culminava na sua imobilidade a meio do percurso, sendo precisas várias tentativas para que conseguissem completar todo o trajeto.
- iii. Footprint: consiste no método mais utilizado para a análise da marcha. Neste caso, as patas dianteiras dos murganhos foram pintadas com tinta vermelha e as traseiras

com tinta azul. Após o seu deslocamento ao longo de um corredor, as pegadas ficarão marcadas com as diferentes cores no papel colocado na superfície e, posteriormente, analisadas. Assim como foi mencionado para o *rotarod*, também o *footprint* é aplicado para observação da coordenação motora assim como sincronização.

- iv. Swimming: utilizado para avaliar a coordenação dos membros utilizados durante a locomoção voluntária. O murganho é colocado numa extremidade do poço que contém água, existindo na outra extremidade uma plataforma segura ao nível da água, que devem alcançar e ser capazes de subir.

É importante ter em conta que, em cada um dos comportamentos analisados, é necessária a realização de um *trial* que não é inserido nos resultados finais, para treinar os animais, de modo a que conheçam o procedimento, e, principalmente, que saibam onde poderão encontrar as plataformas estáveis nos diferentes testes.

### **2.1.1.2. Análise dos resultados obtidos nos testes de comportamento animal**

A análise rigorosa e aprofundada de cada um dos testes de comportamento, nomeadamente a interpretação das diferenças existentes nos diferentes intervalos de tempo, permite, como mencionado anteriormente, o acompanhamento do fenótipo dos animais, fornecendo, assim, informações acerca da eficácia de diferentes tratamentos e/ou da evolução da doença. Em cada um dos testes serão retirados diferentes dados que, por sua vez, darão origem a diferentes resultados que, juntos, culminarão numa conclusão final. No *rotarod* obteve-se, em minutos, o tempo que os murganhos conseguiram permanecer na barra giratória, bem como as velocidades alcançadas. Por outro lado, nas varas em altura/*beam walking*, assim como no *swimming*, foi contabilizado o tempo que necessitaram para atingir a plataforma segura situada no outro extremo do percurso. Por fim, através das pegadas obtidas no *footprint*, são obtidas diferentes medidas: comprimento da passada, largura da base e sobreposição das patas (Anexo I).

Durante a análise que tive a oportunidade de realizar, constatei que, para além do rigor exigido nos procedimentos em si, também a aplicação deste na análise final dos resultados é crucial para a excelência de um estudo que envolve modelos animais, uma vez que apenas a correta execução deste passo, poderá dar origem a conclusões relevantes e só assim existirá aceitação por parte da comunidade científica.

### **2.1.1.3. Cirurgias em animais**

Neste estágio pude estar presente na realização de cirurgias nos murganhos, nomeadamente a nível cerebral – Cirurgia extereotáxica. Estas podem ser realizadas com diversos fins, como é o caso da injeção de vírus, que darão origem a proteínas mutadas associadas à doença em estudo, de forma a criar um modelo de doença e, posteriormente, serem estudados não só os mecanismos associados, mas também possíveis estratégias terapêuticas. Este é um procedimento extremamente rigoroso, sendo exigida uma precisão de injeção bastante elevada. Os operadores baseiam-se em atlas do cérebro de murganho (Anexo 2) para obter as coordenadas específicas da região onde pretendem efetuar a injeção que se realiza através de um equipamento indicado para este fim (analisado mais pormenorizadamente no ponto 2.1.6).

### **2.1.1.4. Sacrifício de animais e posterior colheita de cérebros**

No caso dos ensaios realizados para o estudo de doenças neurodegenerativas, é bastante frequente que se proceda ao sacrifício dos animais em estudo, uma vez que, para além da observação das mudanças fenotípicas, também a origem das doenças e das alterações existentes têm de ser estudadas, sendo necessário o acesso e investigação ao cérebro dos animais em questão.

Após o sacrifício realizado através da utilização de anestésicos, uma vez que o cérebro é o objeto de estudo necessário, procede-se à colheita deste. Sendo um procedimento complexo, foi de extrema importância para o meu estágio poder familiarizar-se com cada um dos passos realizados pelos operadores, bem como com os materiais e reagente utilizados, esclarecendo assim os conceitos teóricos relacionados.

O contacto com todos estes procedimentos que envolvem modelos animais permitiu-me ter uma perceção mais aprofundada dos desafios impostos diariamente a nível da sua utilização destes para o estudo da doença de *Machado-Joseph*. Constatei assim que uma boa manipulação dos animais depende de diversos fatores, tanto a nível dos próprios e da existência de variáveis entre estes, como a nível do indivíduo que está a executar o procedimento. Esta correta manipulação permite a prevenção de lesões nos animais e no operador, conduzindo a um estado mais tranquilo nos murganhos e, conseqüentemente melhor efetividade nas atividades e melhores resultados finais no estudo a ser realizado. O contacto com todas estas tarefas realizadas pelos diversos operadores constitui um ponto forte bastante relevante do meu estágio em investigação, uma vez que cada uma delas exige diferentes cuidados e conhecimentos, constituindo uma extensa fonte de aprendizagem.

### **2.1.2. Observação de cortes de cérebros**

Após serem retirados dos animais, os cérebros são colocados em paraformaldeído 4% durante dois dias e depois em sacarose 25% com o objetivo de desidratar. Por fim, procede-se ao seu armazenamento que deverá ser feito a - 80°C. Tive a possibilidade observar o corte de alguns cérebros de murganho, que é realizado estando estes congelados. Para este fim, é utilizado um equipamento específico, que será abordado com mais pormenor no ponto 2.1.6.. O corte dos cérebros em diversas secções possibilita a execução de diferentes análises em cada uma delas, observando-se as várias regiões cerebrais que se pretende com elevado rigor, devido à possibilidade do corte de secções extremamente finas (25-30 µm)

### **2.1.3. Execução de imunohistoquímica**

Uma vez que a doença de *Machado-Joseph* implica a acumulação de agregados proteicos a nível cerebral, causando neurotoxicidade, são largamente utilizadas técnicas que permitem avaliar a presença de antígenos (por ex., proteínas), como é o caso da imunohistoquímica e da imunofluorescência. Como os nomes indicam, são utilizadas em ambas anticorpos para deteção do antígeno que se pretende. Na imunohistoquímica recorre-se a amplificação de sinal, o que constitui uma vantagem em relação à imunofluorescência, pois não são necessários microscópios tão complexos para a visualização final. Por outro lado, a imunofluorescência permite a quantificação da intensidade da reatividade do sinal (uma vez que, neste caso, existem ferramentas para tal), ao contrário do que acontece com a imunohistoquímica, que nos dá indicação da presença/ausência de reatividade em áreas específicas, mas a intensidade acaba apenas por ser avaliada semi-quantitativamente. Neste estágio participei na realização de uma imunohistoquímica nas secções de cérebro obtidas no passo do “corte de cérebros”.

### **2.1.4. Extração de DNA plasmídico de bactérias**

A inserção de um plasmídeo em bactérias denomina-se transformação e pode ser realizada através de choque térmico. Após este passo, as bactérias são aplicadas em contacto com diferentes antibióticos em placas de Petri, seleccionando-se aquelas que mostram resistência, uma vez que serão aquelas que contêm o plasmídeo de interesse associado a um gene que lhe confere a resistência. Procede-se ao crescimento destas bactérias em pré-inóculos, e à realização de uma extração de DNA utilizando o *kit* miniprep de modo a verificar se o DNA se encontra bem inserido nas bactérias (através de uma digestão enzimática por ex. ou por sequenciação) e, depois disso, efetua-se a extração de DNA em grande escala através do *kit* maxiprep. Durante o estágio realizei este último procedimento (maxiprep) que engloba



diversos passos, envolvendo colunas de eluição e variadas centrifugações. Após a realização deste, o DNA pode ser utilizado para diferentes fins, como é o caso da transfeção de células e a produção viral (neste caso, lentivírus ou vírus adeno-associados (AAV)).

### **2.1.5. Extração de RNA e proteína pelo método de trizol**

O método de trizol consiste num conjunto de passos que tem como objetivo a extração de RNA, DNA e proteína de diferentes tecidos. Para a execução deste método utilizámos tecido cerebral obtido a partir de murganhos que tinham sido sujeitos a determinado tratamento. Sendo a pesquisa relacionada com a doença de *Machado-Joseph*, é importante avaliar de que forma os tratamentos reduzem a expressão de RNA e de proteínas, tendo sido realizado o método o trizol com este intuito. Tendo em conta que a finalidade é a extração de RNA e que este é uma molécula instável, principalmente quando em contacto com as RNAses (responsáveis pela sua degradação), um cuidado de extrema importância durante todo o procedimento é certificar-se de que nenhum material utilizado contenha estas enzimas, usando material estéril e livre de RNAses, e o local onde se efectua a extração ser limpo nesse sentido (recorrendo-se a líquidos de limpeza (RNase AWAY™ Surface Decontaminant por exemplo). Para que se garantam estas condições, é utilizado também álcool puro e água sem RNAses para formar o álcool a 70% necessário. O estágio permitiu-me observar e estudar pela primeira vez este método, tendo-me sido esclarecidas todas as dúvidas acerca deste.

### **2.1.6. Equipamento variado**

A tecnologia representa uma base essencial de qualquer área, incluindo a investigação científica. Neste sentido, é importante que exista a capacidade de se adaptar à sua evolução, reforçando diariamente as nossas capacidades profissionais e científicas com a aprendizagem da utilização de novos equipamentos. O meu estágio em investigação científica no Centro de Neurociências de Coimbra deu-me a conhecer alguns equipamentos bastante relevantes na área, destacando-se:

- i. Rotarod (Anexo 3): Alguns dos testes comportamentais executados com murganhos exigem a utilização de equipamentos eletrónicos, como é o caso do *Rotarod*, cujo conceito se baseia numa barra giratória dividida em diversos compartimentos, possibilitando a realização do teste em vários animais em simultâneo. Sendo este teste comportamental dividido em estacionário e acelerado, o primeiro passo será a seleção de um destes modos, e, de seguida, a velocidade (no caso do estacionário) ou aceleração (no caso do acelerado) pretendida. O resultado é apresentado em minutos,

o qual é obtido aquando da queda do murganho numa superfície que se destranca e pára a contagem.

- ii. Criostato (Anexo 4): O corte de cérebros de murganhos referido no ponto 2.1.2. é efetuado após a sua congelação, sendo, desta forma, necessário que estes mantenham esta propriedade aquando do corte. O criostato consiste num equipamento capaz de manter temperaturas baixas, sendo, por isso, utilizado neste procedimento. A junção desta propriedade com o sistema de mecânica existente permite que sejam efetuados cortes de secções extremamente finos e rigorosos, controlando-se tanto a temperatura, como a posição do cérebro e a espessura pretendida.
- iii. Quadro estereotáxico (Anexo 5): Os estudos em questão impunham a realização de cirurgias cerebrais aos murganhos, com o objetivo de injetar vírus, por exemplo. Desta forma, é crucial que cada um dos passos seja devidamente controlado e minuciosamente calculado. Para isso, são utilizados equipamentos com elevada precisão e rigor, como é o caso do quadro estereotáxico. Através deste, é possível definir as coordenadas requeridas para a injeção, sendo o próprio a realizar a deslocação, de acordo com o que é pretendido. Assim, o risco humano é diminuído, uma vez que não é necessário o deslocamento manual entre cada uma das injeções.

As competências adquiridas através da utilização de cada um destes equipamentos serão responsáveis pelo crescimento do farmacêutico, distinguindo-o de outros profissionais e, desta forma, o contacto que me foi permitido com aqueles, foi uma mais valia tanto a nível académico, como para o meu futuro enquanto futura farmacêutica.

### **2.1.7. Realização de uma formação de sala de culturas**

A cultura de células trata-se do desenvolvimento destas sob condições controladas e propícias e é uma das tarefas utilizadas durante o estudo de diferentes doenças. Estas são obtidas em salas de culturas, sendo, por isso, essencial conhecer todos os cuidados a ter na utilização destas. Durante o estágio tive a oportunidade de realizar uma formação onde me foram transmitidos os componentes básicos destas salas, assim como as precauções a ter e os erros mais frequentes a evitar. As câmaras de fluxo laminar são um dos equipamentos presentes e requerem cuidados de utilização que assentam em conceitos básicos acerca desta, como é o caso de nunca se dever passar com as mãos ou qualquer outro material por cima do trabalho que está a ser realizado, uma vez que o fluxo de ar é direcionado de cima para baixo, correndo-se o risco de contaminação. Assim, os conhecimentos adquiridos durante esta formação poderão ser ferramentas essenciais do meu futuro profissional.

### **2.1.8. Rotatividade das atividades**

Uma das características mais exigidas no farmacêutico é a versatilidade, devendo ser capaz de se adaptar a diferentes ambientes e aplicar os seus conhecimentos em diversas áreas, sem que o desafio da aprendizagem contínua o impeça de alcançar novas metas. Neste sentido, a diversidade de tarefas que me foi dada a oportunidade de realizar ao longo de todo o período de estágio permitiu-me sentir esta dinâmica, consciencializando-me de que toda e qualquer aprendizagem será sempre uma mais valia, sendo necessário destacar-se a vários níveis. Esta pluralidade de atividades apresentada tornou-se possível graças à rotação dentro do grupo que me foi permitida, bem como devido ao facto de que área de investigação científica não ser uma linha contínua da realização da mesma tarefa diariamente. Assim, a rotatividade das atividades dentro do grupo foi um dos pontos fortes mais relevantes do meu estágio.

### **2.1.9. Equipa dinâmica e de excelência**

Qualquer estudo realizado em investigação científico é avaliado segundo os resultados obtidos e estes dependem, para além do equipamento utilizado, do operador que conduz esse mesmo estudo. Desta forma, existem qualidades que são expectáveis de encontrar num profissional de excelência desta área, tais como responsabilidade, rigor científico na execução de cada passo, dinamismo e autonomia. Cada um dos elementos do grupo que tive a possibilidade de integrar contém estas características, tendo-me sido transmitido todo o tipo de conhecimento sem qualquer reticência.

É importante realçar que uma equipa unida resultará numa maior troca de informações, e, conseqüentemente, num crescimento pessoal e profissional significativo. A disponibilidade que me foi cedida, em conjunto com o facto de cada um dos elementos ter uma sabedoria ilimitada, conduziu significativamente à expansão dos meus conhecimentos, sem receios de esclarecer todas as dúvidas que surgiam.

## **2.2. Pontos Fracos (*Weaknesses*)**

### **2.2.1. Impossibilidade de contacto com alguns equipamentos devido à sua ausência**

Apesar do avanço tecnológico ser uma mais valia a nível mundial, este também poderá ser difícil de acompanhar tendo em conta que equipamentos mais modernos e complexos implicam um investimento que, por vezes, se torna impossível. Da mesma forma que acontece nas restantes áreas, também a investigação científica se encontra enquadrada nesta realidade. Assim, verifica-se a ausência de alguns equipamentos com os quais poderia ter sido importante ter tido contacto durante o estágio.

Tendo em conta que a minha experiência foi maioritariamente focada em comportamento animal, reforço o *footprint* automatizado que, apesar de existir, não se encontrava presente nas instalações. Este trata-se, como o nome indica, de uma versão automatizada do teste para avaliação da marcha dos animais, tornando-se mais rigoroso e menos trabalhoso do que a realização manual do mesmo. O facto de não existirem certos equipamentos como este impediu que me familiarizasse com o seu modo de funcionamento. Desta forma, esta ausência constitui o único ponto fraco existente durante todo o período desta experiência.

### **2.3. Oportunidades (*Opportunities*)**

#### **2.3.1. Facilidade na procura e troca de informação científica**

O crescimento tecnológico e informático exponencial observado ao longo dos últimos anos permitiu a ascensão de diversos setores, como é o caso da investigação. Durante o estágio constatei a importância deste facto em vários níveis, nomeadamente na troca de informação científica. A existência de inúmeras plataformas eletrónicas onde são publicados diariamente artigos relacionados com os mais diversos temas permite que as dúvidas que surjam durante a realização dos estudos sejam facilmente esclarecidas através do trabalho realizado por outros. É também importante que, mesmo na ausência de dúvidas, se tenha a capacidade de manter atualizado o conhecimento adquirido acerca dos temas em que estamos inseridos, ou de outros existentes na comunidade científica, o que, mais uma vez, nos distinguirá de outros profissionais.

Além da facilidade de encontrar referências para as dúvidas que tinha, a grande facilidade de troca de informação a nível global permitiu-me também adquirir uma maior autonomia e espírito crítico, de modo a selecionar aquela que seria relevante e distingui-la daquela que poderia não ter o rigor necessário. Estas são características essenciais em qualquer atividade futura que desempenharei enquanto profissional em farmácia, tendo sido, desta forma, um ponto forte extremamente relevante do meu estágio.

#### **2.3.2. Horários flexíveis dos profissionais**

Ao longo deste relatório demonstrei a dinâmica existente na área da investigação, em que são realizadas múltiplas tarefas diferentes. Desta forma, os profissionais necessitam de ser autónomos e ter um vasto leque de conhecimento em diversos temas. A realização de todos estes procedimentos é suportada por um conjunto de horas de trabalho e empenho. Ao contrário do que acontece em muitas outras áreas, a investigação científica oferece liberdade

de horário, ou seja, os investigadores poderão trabalhar em laboratório no seu projeto sempre que necessário, sem existir qualquer tipo de restrição. Enquanto estudante e estagiária, a flexibilidade de horários permitiu-me o contacto com diversas experiências, em espaços de tempo diferentes, o que poderia não ser possível caso todos estivessem limitados a determinado horário.

## **2.4. Ameaças (*Threats*)**

### **2.4.1. Restrição da informação autorizada a transmitir**

É importante que, durante o estágio, o esforço para a aprendizagem esteja sempre presente, sendo esse o principal objetivo. Algumas das pessoas com as quais tive a oportunidade de aprender encontravam-se a trabalhar para empresas, o que significa que grande parte das informações sobre o estudo não me podia ser transmitida. Esta foi uma das ameaças existentes, uma vez que, por vezes, apesar de estar a analisar os procedimentos efetuados, não era capaz de os contextualizar, tornando-se mais difícil de esclarecer a importância de certos passos.

### **2.4.2. Não ter o curso de experimentação animal**

Como já referi, grande parte do meu estágio foi focado no comportamento animal, no entanto, a manipulação destes requer um curso de experimentação animal que ainda não tive a oportunidade de realizar. Sendo este ramo da investigação científica centrado no contacto com os animais e, tendo em conta todos os fatores que influenciam esta manipulação, apenas a experiência prática será responsável pelo aperfeiçoamento e trará a o conforto necessário para o operador e, conseqüentemente, para os animais. Desta forma, apesar de ter observado várias vezes todos as etapas e saber os fundamentos teóricos, não pude efetuar a manipulação dos murganhos, o que seria de extrema importância para me habituar a este conceito e para uma possível realização como futura profissional na área das ciências farmacêuticas.

### 3. Conclusão

A investigação científica é uma área com uma importância global extremamente elevada é caracterizada pela exigência de uma aprendizagem diária, bem como pela superação diária de vários desafios. O avanço tecnológico observado ao longo dos anos tem conduzido a técnicas aperfeiçoadas de pesquisa, melhorando os resultados que se podem obter ao longo dos estudos. Além disso, tem-se também verificado uma globalização da informação, providenciando fortes referências de leitura aos investigadores (definidos como “os profissionais que trabalham na conceção ou na criação de novos conhecimentos” no Decreto-Lei nº 94/2019, de 16 de maio <sup>(6)</sup>) que, a qualquer momento, serão capazes de atualizar o seu conhecimento acerca do tema desejado e acerca do trabalho que outros profissionais têm desempenhado. Forma-se assim uma comunidade científica potente constituída por indivíduos com competências e saberes incalculáveis.

O estágio no Centro de Neurociências e Biologia Celular possibilitou-me o contacto com uma realidade diferente, a nível de estágios, de todas as que tinha vivenciado antes, revelando as inúmeras capacidades com que nós, enquanto estudantes do mestrado integrado em ciências farmacêuticas, adquirimos ao longo do nosso percurso académico. A exigência de cada uma das tarefas bem como a vontade de obter resultados significantes leva a um esforço voluntário de cada um dos profissionais. O grupo de investigação no qual fui inserida suscitou em mim um fascínio e admiração impossíveis de demonstrar, uma vez que cada um deles era dotado de um conjunto de qualidades imprescindíveis e, no entanto, raras, mostrando empenho e paixão diariamente, apoiados pelas suas mentes brilhantes com conhecimentos ilimitados. Além disto, foi demonstrada união, companheirismo e entreatajuda que considero fundamentais para sucesso de qualquer equipa e que, enquanto estagiária, me proporcionou uma aprendizagem completa, contanto com o apoio de cada um dos elementos para qualquer tarefa ou esclarecimento.

O contacto com a realidade profissional mostrou-me, uma vez mais, as responsabilidades implicadas e o quanto é importante a realização de cada atividade com o maior esforço possível, procurando sempre apoiar-se com todos os conhecimentos adquiridos ao longo do tempo.

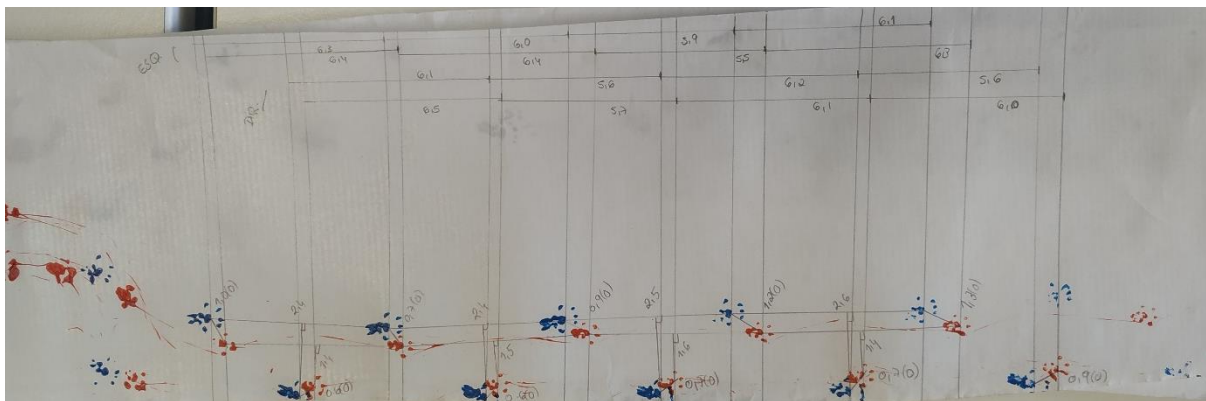
Finalizo assim este relatório com uma nova perspetiva no que toca à investigação científica e motivada a manter a aprendizagem e o espírito crítico ao longo de toda a vida profissional.

#### 4. Referências Bibliográficas

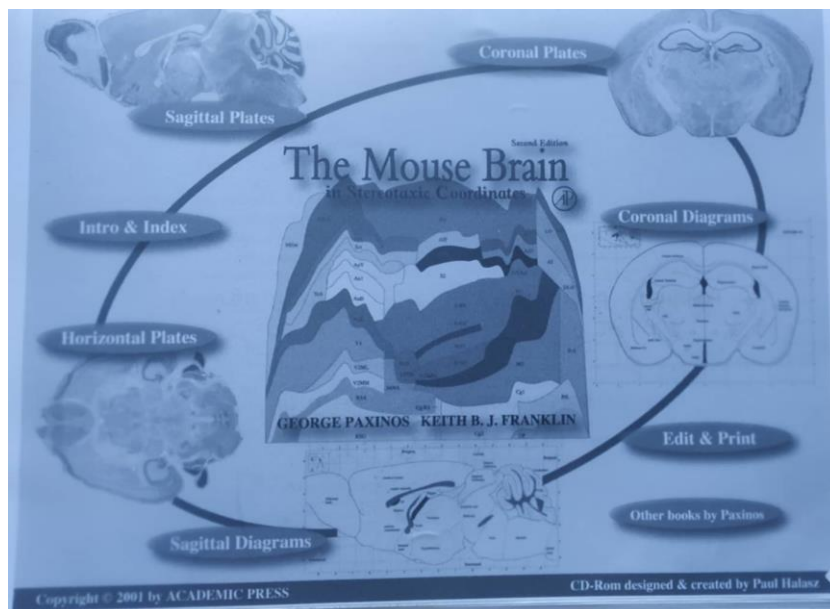
- 1 - NÓBREGA, C.; MENDONÇA, I.; MARCELO, A.; LAMAZIÈRE, A.; TOMÉ, S.; DESPRES, G.; MATOS, C.A.; MECHMET, F.; LANGUI, D.; DUNNEN, W.; ALMEIDA, L.P.; CARTIER, N.; ALVES, S.; - **Restoring brain cholesterol turnover improves autophagy and has therapeutic potential in mouse models of spinocerebellar ataxia.** *Acta Neuropathologica.* (2019).
- 2 - FFUC, Normas Orientadoras da unidade curricular “Estágio” 2018/2019; acessado a 30 de agosto de 2019
- 3 - DECRETO-LEI nº 1/2019 de 10 de janeiro. *Diário da República nº 7/2019 - 1ª Série.* Presidência do Conselho de Ministros.
- 4 - DECRETO-LEI nº 113/2013 de 7 de agosto. *Diário da República nº 151/2013 - 1ª Série.* Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento de Território.
- 5 - BROOKS, S.P.; DUNNETT, S.B. - **Tests to assess motor phenotype in mice: A user’s guide.** *Nature Reviews Neuroscience.* 10,7 (2009) 519–529.
- 6 - PORTARIA nº 97/2018 de 9 de abril. *Diário da República nº 69/2018 - 1ª Série.* Saúde.

## Anexos

### Anexo I | Análise das passadas obtidas no teste de comportamento animal *footprint*

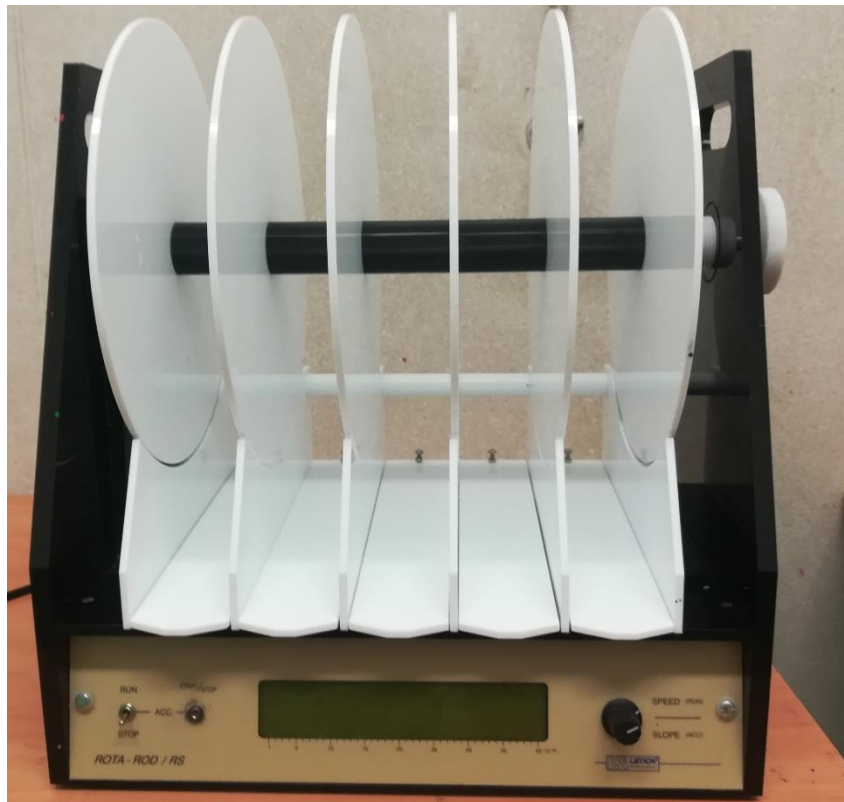


### Anexo 2 | Atlas do cérebro de murganho

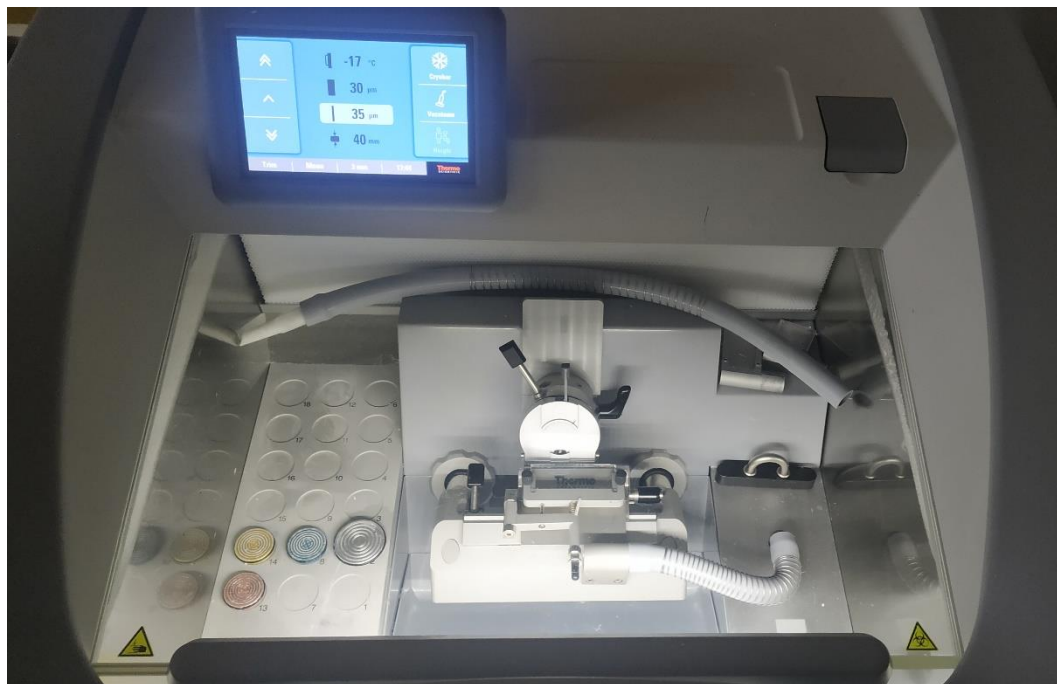




### Anexo 3| Rotarod



### Anexo 4| Criostato



## Anexo 5| Quadro estereotáxico



## PARTE III

**“Novos Mecanismos de Nitração *in vivo*: o efeito do nitrato da dieta na formação de ácidos gordos nitrados com ação anti-inflamatória”**

## Lista de Abreviaturas

**CDDO-Me** - Metil Bardoxolona

**cGMP** - Monofosfato cíclico de guanosina

**cLA** - Ácido Linoleico conjugado

**Cys** - Cisteína

**DMF** - Dimetil fumarato

**DNA** - Do Inglês, *Deoxyribonucleic Acid*

**FDA** - Do inglês, *Food and Drug Administration*

**GSH** - Glutathiona

**HER2** - recetores de tirosina cinase ERB2

**HNO<sub>2</sub>** - Ácido Nitroso

**HO-I** - Heme oxigenase I

**HSE** - Elementos de Choque Térmico

**HSF-I** - Do inglês, *Heat shock factor I*

**HSP** - Proteínas de Choque Térmico

**HSR** - Resposta de Choque Térmico

**IκBα** - Inibidor da IκB

**IKK** - Cinase da IκB

**iNOS** - Óxido Nítrico - sintase induzida

**Keap1** - Do inglês, *Kelch-like ECH-associated protein 1*

**MG/DG/TG** - Mono / Di / Triglicerídeo

**NAFLD** - Fígado gordo não alcoólico

**NASH** - Esteato-Hepatite não alcoólica

**Neh** - Do inglês, *NRF2-ECH homology*

**Nf-κB** - Fator Nuclear Kappa B

**NO** - Óxido nítrico

**NO<sub>2</sub>** - Dióxido de Azoto

**NO<sub>2</sub>-FA** - Ácidos gordos nitrados

**NO<sub>2</sub>-LA** - Ácido linoleico nitrado

**NO<sub>2</sub>-OA** - Ácido oléico Nitrado

**Nrf2** - Do inglês, *nuclear factor E2-related factor 2*

**NRs** - Recetores Nucleares

**PPAR** - Do inglês, *Peroxisome proliferator-activated receptor*

**PTM** - Modificações pós traducionais

**RE** - Recetor de estrogénio

**RGZ** - Rosiglitazona

**RP** - Recetor de progesterona

**SUMO** - Pequenos Modificadores Similares à ubiquitina

**symN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>** - N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> simétrico

**TLR4** - Do inglês, *Toll-like receptor 4*

**TNF $\alpha$**  - Fatores de Necrose Tumoral Alfa

**TRAF6** - Do inglês, *TNF receptor-associated factor 6*

**TZD** - Glitazonas

## **I. Abstract**

Fatty acids are essential components of biological membranes and lipoproteins, and may give rise to nitro-fatty acids through a nitration reaction. The formation of nitrating species is likely in acidic conditions as well as under an inflammatory insult where oxygen and nitrogen reactive species are increased. Despite initial data suggesting that polyunsaturated bis-allylic fatty acids were the preferential substrate, it is now known that both in vitro and in vivo nitration are more likely to occur in conjugated unsaturated fatty acids. Nitrated fatty acids are detected in human blood and urine at nanomolar range and are increased upon the ingestion of a diet containing nitrate, nitrite and unsaturated fatty acids. The chemical properties of nitrated fatty acids, such as electrophilicity promote the pleiotropic modulation of many signaling pathways through nitroalkylation reactions. Therefore, NO<sub>2</sub>-FA are capable of exerting anti-inflammatory effects and modulating activities of both lipid and glucose metabolism, thus being potential candidates for the treatment of several inflammatory and metabolic diseases.

**Keywords:** Nitro-fatty acids; Nitration; Inflammation; Metabolism; Mediterranean diet; Review.

## Resumo

Os ácidos gordos são componentes essenciais das membranas biológicas e das lipoproteínas, podendo sofrer reações de nitração que dão origem a ácidos gordos nitrados (NO<sub>2</sub>-FA). Esta reação é favorecida em meio ácido e em situações de *stress* inflamatório, onde as espécies reativas de oxigênio e de azoto se encontram aumentadas. Apesar de inicialmente se pensar que o substrato de eleição seriam os ácidos gordos poli-insaturados bis-alílicos, sabe-se agora que a nitração *in vivo* e *in vitro* ocorre preferencialmente em ácidos gordos poli-insaturados conjugados. Em condições fisiológicas, é possível detetar NO<sub>2</sub>-FA na urina e no plasma humano na ordem do nanomolar, sendo estes valores influenciados pela dieta, nomeadamente pela ingestão de alimentos contendo nitrato, nitrito e ácidos gordos insaturados. As propriedades químicas destas moléculas, como é o caso da sua natureza eletrofílica, permitem que, através de reações de nitroalquilação, tenham um efeito pleiotrópico, interagindo com diferentes vias de sinalização celulares. Assim, os NO<sub>2</sub>-FA são capazes de exercer atividades anti-inflamatórias e de modulação do metabolismo de lípidos e da glicose sendo, desta forma, potenciais candidatos para o tratamento de diversas doenças inflamatórias e/ou metabólicas.

**Palavras-Chave:** Ácidos gordos nitrados; Nitração; Inflamação; Metabolismo; Dieta mediterrânea; Revisão.

## 2. Introdução

Os ácidos gordos livres e esterificados, nutrientes essenciais de diferentes tipos de dieta, são constituintes importantes de membranas biológicas e de lipoproteínas, podendo ser modificados por reações de oxidação e de nitração (Trostchansky e Rubbo, 2008) (Spector e Kim, 2015). Apesar da actividade anti-inflamatória de alguns ácidos gordos ser reconhecida, nomeadamente através da modulação de vias de sinalização celular tais como a via do Fator Nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B), apenas nas últimas décadas se começaram a estudar os efeitos dos seus derivados nitrados (Bonacci *et al.*, 2012).

A nitração de ácidos gordos resulta da reacção do radical dióxido de azoto ( $\cdot$ NO<sub>2</sub>) com ácidos gordos insaturados. Os ácidos gordos nitrados (NO<sub>2</sub>-FA) obtidos nesta reacção são espécies altamente electrófilas, propriedade química que lhes confere uma bioatividade significativa devido à capacidade de reagir com nucleófilos. Apesar desta propriedade ser descrita com mais detalhe no capítulo 4 (“Propriedades químicas, metabolismo e distribuição dos ácidos gordos nitrados”), pode-se desde já realçar que a reacção de NO<sub>2</sub>-FA com aminoácidos (espécies nucleofílicas) leva à formação de adutos covalentes através da reacção de adição de Michael (Trostchansky e Rubbo, 2008) (Woodcock *et al.*, 2013). Como adiante se verá, este é um dos principais mecanismos pelos quais os NO<sub>2</sub>-FA exercem as suas acções biológicas.

A formação, quantificação, caracterização, metabolismo e funções biológicas dos NO<sub>2</sub>-FA têm sido bastante estudados nos últimos anos, com o objetivo de esclarecer a sua importância em condições fisiológicas e patológicas. Do ponto de vista metodológico, a deteção e quantificação de NO<sub>2</sub>-FA no plasma, urina e tecidos do homem tem sido um desafio importante. Os primeiros estudos mostravam concentrações plasmáticas de aproximadamente 600nM de NO<sub>2</sub>-OA livre (Schopfer *et al.*, 2005), no entanto, dados mais recentes indicam que, em indivíduos saudáveis, as concentrações deverão estar duas ordens de magnitude abaixo, atingindo, aproximadamente 1nM (Tsikas *et al.*, 2009) (Buchan *et al.*, 2018). Também se tem demonstrado que, além de estarem presentes, os seus níveis aumentam bastante em condições inflamatórias e/ou de *stress* oxidativo (Ferreira *et al.*, 2008) (Melo *et al.*, 2018). O ácido linoleico conjugado nitrado (NO<sub>2</sub>-cLA) é o NO<sub>2</sub>-FA com maior taxa de formação endógena, sendo detetado em maior quantidade *in vivo*, no entanto, a sua estabilidade em meio aquoso é baixa, ao contrário do que acontece com o ácido oleico conjugado nitrado (NO<sub>2</sub>-OA), que é relativamente estável em todos os meios (Bonacci *et al.*, 2012) (Ferreira *et al.*, 2012).

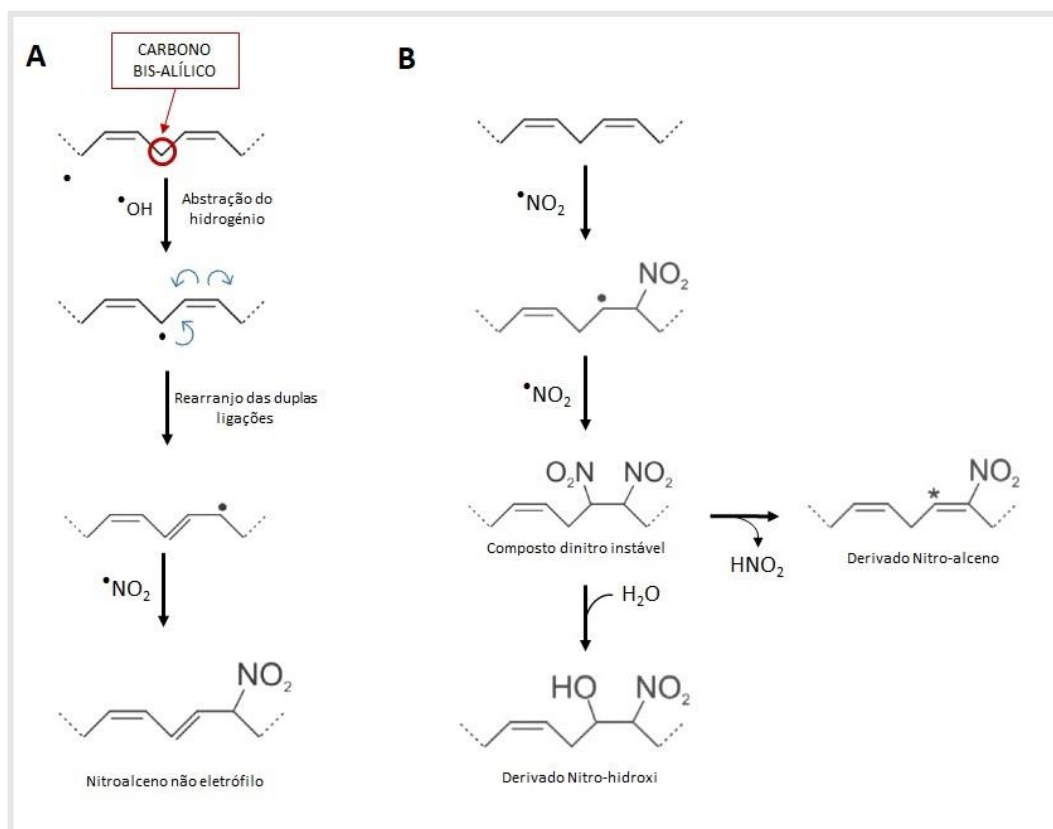


As premissas presentes nesta monografia têm como objetivo resumir e analisar de forma crítica os conhecimentos existentes acerca da formação, caracterização, metabolismo e funções biológicas dos NO<sub>2</sub>-FA, nomeadamente a sua influência nas diferentes vias de sinalização celular e, conseqüentemente, a sua importância como arma terapêutica no tratamento de doenças com incidência significativa na população mundial.

### 3. Síntese de ácidos gordos nitrados

#### 3.1. Mecanismos de nitração de ácidos gordos insaturados

Os ácidos gordos podem sofrer reações de nitração ou de oxidação, dependendo da tensão de oxigénio presente no meio. Ao contrário do que acontece com a oxidação, cujos mecanismos estão relativamente bem estudados, os mecanismos de nitração *in vivo* são menos compreendidos (Buchan *et al.*, 2018) (Trostchansky e Rubbo, 2008). Neste contexto, e através da utilização de diferentes abordagens experimentais, têm sido propostos vários mecanismos de nitração, sendo que todos sugerem que os produtos da reacção dependem largamente das características estruturais dos diferentes ácidos gordos insaturados. (Woodcock *et al.*, 2013). A título de exemplo, no caso dos NO<sub>2</sub>-FA que têm como precursores ácidos gordos poli-insaturados bis-álílicos, os mecanismos propostos para a sua formação são os que se representam na figura abaixo (Woodcock *et al.*, 2013) (Buchan *et al.*, 2018):



**Fig.1.** Mecanismos de nitração propostos para a formação de NO<sub>2</sub>-FA a partir de ácidos gordos gordos poli-insaturados bis-álílicos. Imagem adaptada de: RUBBO, H. - **Nitro-fatty acids: Novel anti-inflammatory lipid mediators.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 46:9 (2013) 728–734 ; BUCHAN, G.J. *et al.* - **Nitro-fatty acid formation and metabolism.** *Nitric Oxide - Biology and Chemistry.* 79 (2018) 38–44.

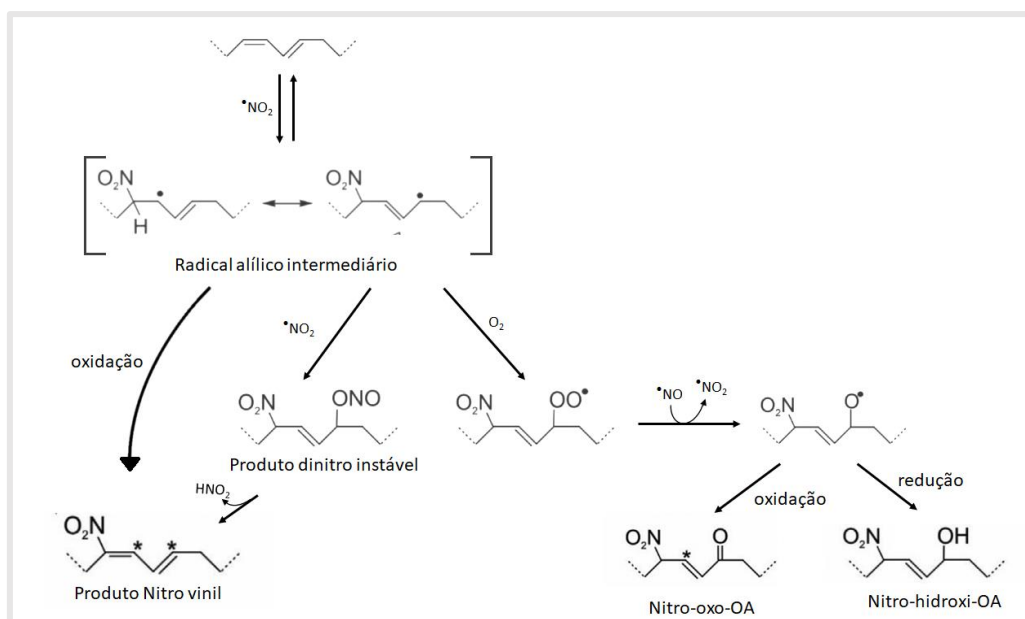
I. Para o primeiro mecanismo proposto é necessária a presença de um radical capaz de realizar a abstração do hidrogénio do carbono bis-álílico. Este primeiro passo pode ser realizado por diferentes radicais, como é o caso do  $\cdot\text{NO}_2$  e do hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ). Resulta assim

um radical alílico que, ao sofrer um rearranjo das duplas ligações e a inserção de um  $\cdot\text{NO}_2$ , leva à formação de um nitroalceno não eletrófilo (Fig. 1A) (Buchan *et al.*, 2018).

II. O segundo mecanismo proposto mostra uma adição direta de outro  $\cdot\text{NO}_2$ , formando um intermediário que, por perda de  $\text{HNO}_2$ , origina o derivado nitroalceno. Por outro lado, caso o intermediário sofra hidrólise, pode formar-se um derivado nitro-hidroxi, ao invés do passo descrito anteriormente (Fig. 1B) (D'Ischia *et al.*, 2011) (Buchan *et al.*, 2018) (Rubbo, 2013) (Trostchansky e Rubbo, 2008).

Estes mecanismos sugerem que os produtos formados dependem da estratégia de síntese utilizada, sendo este ponto particularmente relevante para se obterem relações diretas entre os mecanismos e os produtos. Desta forma, aquando da síntese de  $\text{NO}_2$ -FA, a deteção de outros produtos será esperada e devidamente justificada (Woodcock *et al.*, 2013).

Os estudos realizados ao longo dos últimos anos, permitiram constatar que a nitração de ácidos gordos poli-insaturados bis-alílicos não é favorecida em condições fisiológicas. Trabalhos iniciais sugeriam que estes ácidos gordos seriam o substrato de eleição, tendo em conta a abundância e acidez do hidrogénio bis-alílico. No entanto, segundo Bonacci *et al.* (2012), os ácidos gordos poli-insaturados conjugados – nomeadamente o Ácido Linoleico conjugado (cLA) – revelaram ser o substrato preferencial para a nitração *in vivo* e *in vitro* (Bonacci *et al.*, 2012). A nitração do cLA começa, como no caso dos ácidos gordos com carbono bis-alílico, pela adição direta de  $\cdot\text{NO}_2$ , da qual resulta um radical alílico que pode sofrer várias reações:



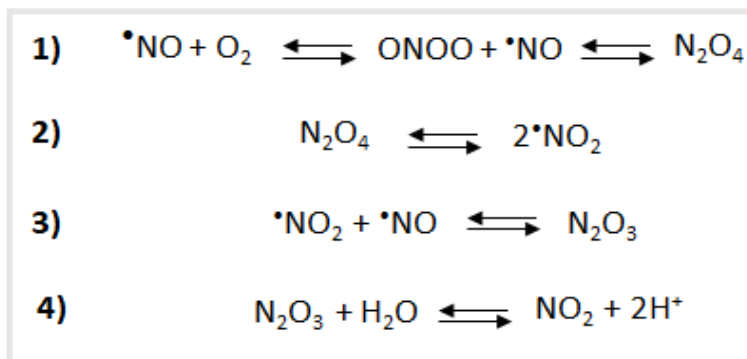
**Fig.2.** Mecanismos de nitração do Ácido Linoleico conjugado. Imagem adaptada de BUCHAN, G.J. *et al.* - **Nitro-fatty acid formation and metabolism.** *Nitric Oxide - Biology and Chemistry.* 79 (2018) 38–44.

I. Pode sofrer uma reação de oxidação, formando novamente um sistema dieno conjugado, desta vez com um grupo nitro-vinílico (Fig.2A) (Buchan *et al.*, 2018).

II. O segundo mecanismo consiste na adição de outro radical  $\cdot\text{NO}_2$  ao intermediário, originando um produto dinitro. Devido à instabilidade deste composto, haverá uma decomposição rápida, perdendo ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) e formando-se um produto nitro-vinílico, idêntico ao que resultou do mecanismo anterior (Fig.2B) (Buchan *et al.*, 2018).

III. Por último, o radical intermediário pode ser oxidado, gerando-se um composto nitroperoxi. Este, por sua vez, é reduzido a radical alcoxi através da oxidação do óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) a  $\cdot\text{NO}_2$ . Caso exista uma elevada pressão do oxigênio, forma-se um nitro-oxo-ácido-oleico. Por outro lado, se a pressão do oxigênio do meio for reduzida, a reação que ocorre é uma redução, originando como produto um nitro-hidroxi-ácido-oleico (Fig.2C) (Buchan *et al.*, 2018).

Tal como mencionado anteriormente, a nitração de ácidos gordos foi testada em várias condições experimentais *in vitro* e *in vivo*, sendo necessária, em ambas, a presença de  $\cdot\text{NO}_2$  (Buchan *et al.*, 2018). Este radical pode ser formado através de diferentes processos: (a) reação do  $\cdot\text{NO}$  com o radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), formando-se peroxinitrito ( $\text{ONOO}^{\cdot-}$ ), que, ao sofrer uma clivagem homolítica dá origem a  $\cdot\text{NO}_2$  e  $\cdot\text{OH}$  (Rubbo, 2013) (Buchan *et al.*, 2018) ; (b) oxidação do  $\text{NO}_2^-$  pelas hemeperoxidases (Buchan *et al.*, 2018) ; (c) protonação do  $\text{NO}_2^-$  que deverá ser exposto a um ambiente ácido como é o caso, em condições fisiológicas, do lúmen gástrico, originando  $\text{HNO}_2$  (pKa 3.4) que, por sua vez, é convertido em  $\cdot\text{NO}$ ,  $\cdot\text{NO}_2$  e outros óxidos de azoto. Este mecanismo explica o facto da nitração de cLA ser favorecida em compartimentos de pH ácido, onde a protonação do  $\text{NO}_2^-$  é possível (Rubbo, 2013) (Buchan *et al.*, 2018) (Bonacci *et al.*, 2012) ; (d) nitração direta pelo  $\cdot\text{NO}$  (Buchan *et al.*, 2018); (e) auto-oxidação do  $\cdot\text{NO}$  (Vitturi *et al.*, 2015) (Buchan *et al.*, 2018) (Fig.3).



**Fig.3.** Auto-oxidação do radical  $\cdot\text{NO}$ . Imagem adaptada de: VITTURI, D.A. *et al.* - **Convergence of biological nitration and nitrosation via symmetrical nitrous anhydride.** *Nature Chemical Biology.* 11:7 (2015) 504–510.

### 3.2 O papel do óxido nítrico na nitração de ácidos gordos

Num estudo onde foram utilizados isótopos estáveis de azoto para o esclarecimento da complexidade das reações envolvidas na nitração de ácidos gordos, Vitturi *et al.* (Vitturi *et al.*, 2015) mostraram, utilizando uma cultura de células de murganhos semelhante a macrófagos, que o  $\text{NO}_2^-$  é uma fonte importante de  $^1\text{NO}_2$ . Recorrendo a inibidores da óxido nítrico-sintase indutível (iNOS), puderam também concluir que o  $^1\text{NO}$  é essencial para a nitração de cLA dependente de  $\text{NO}_2^-$  induzida pela ativação de macrófagos e mediada por  $^1\text{NO}_2$  (Vitturi *et al.*, 2015). No entanto, é importante ter em conta que o  $^1\text{NO}$  não é diretamente responsável pela reação em causa, uma vez que atua apenas como precursor das espécies que irão induzir a nitração. Assim, é necessário ter em consideração que a auto-oxidação do  $^1\text{NO}$  origina o intermediário principal das reações em questão ( $^1\text{NO}_2$ ) (Buchan *et al.*, 2018). Foi utilizado, no mesmo estudo, um modelo de murganhos em que se induziu inflamação, constatando-se a possibilidade da formação de  $\text{N}_2\text{O}_3$  simétrico ( $\text{symN}_2\text{O}_3$ ). Após homólise, o  $\text{symN}_2\text{O}_3$  é responsável pela formação de espécies nitrantes, sendo este processo independente do pH do meio. A importância da ocorrência desta reação é notável em ambientes que contêm pH fisiológico, onde a formação de espécies nitrantes é comprometida pelo facto do  $\text{NO}_2^-$  não sofrer protonação e, desta forma, não dar origem, por exemplo, ao  $^1\text{NO}$ . (Vitturi *et al.*, 2015).

### 3.3 O efeito da dieta na nitração de ácidos gordos: novos mecanismos de nitração

O papel absolutamente fundamental do  $^1\text{NO}_2$  na nitração de biomoléculas, incluindo ácidos gordos insaturados, está hoje bem estabelecido na literatura. Contudo, recentemente foi descrita uma nova reação conducente à formação deste radical *in vivo* (Rocha *et al.*, 2012) (Bonacci *et al.*, 2012). Assim, o  $^1\text{NO}_2$  pode-se formar no ambiente ácido do estômago, a partir do nitrato da dieta (Rocha *et al.*, 2013). Este último encontra-se presente sobretudo em vegetais de folha verde e na água potável (Jansson *et al.*, 2008) (Weitzberg e Lundberg, 2013). Ao ser ingerido, o nitrato é absorvido no intestino delgado e cerca de 25% é captado pelas glândulas salivares e secretado na cavidade oral. Aqui, bactérias residentes nas criptas posteriores da língua, reduzem o nitrato a nitrito. O nitrito, uma vez misturado com a saliva, é imediatamente protonado no estômago a  $\text{HNO}_2$  que, por sua vez é convertido a  $^1\text{NO}$ ,  $^1\text{NO}_2$  e outros óxidos de azoto (Lundberg, Weitzberg e Gladwin, 2008). Desta forma, o lúmen gástrico reúne as condições químicas ideais para induzir a nitração de ácidos gordos endógenos e exógenos.

Ao fazer referência ao consumo de nitrato na dieta, sob a forma de vegetais de folha verde, não é possível contornar o papel da dieta mediterrânea na formação de  $\cdot\text{NO}$ ,  $\cdot\text{NO}_2$  e  $\text{NO}_2\text{-FA}$ . A dieta mediterrânea é considerada extremamente saudável, contando com a presença de diferentes grupos de alimentos, como é o caso de cereais, legumes, vegetais, frutas e também azeite (D'Alessandro e Pergola, De, 2018). Esta tem inúmeros benefícios, levando a uma menor mortalidade associada a eventos cardiovasculares. O consumo de vegetais faz da dieta mediterrânea uma fonte importante de nitrato, que após ingerido irá sofrer as reações já mencionadas anteriormente. Contudo, também o azeite virgem é parte integrante desta dieta, constituindo a principal fonte de ácidos gordos insaturados. Neste sentido, Fazzari *et al.* (2014) conduziram um estudo com o objetivo de avaliar não só a presença de  $\text{NO}_2\text{-FA}$  em azeitonas e no azeite extra virgem, mas também a formação destes compostos a partir do azeite virgem extra e nitrito em condições ácidas. Estes autores, confirmaram a presença de  $\text{NO}_2\text{-cLA}$  em todos os casos e, através de um modelo *ex vivo* que simula as condições digestivas, demonstraram que a presença de nitrito noutros alimentos promove a formação de  $\text{NO}_2\text{-FA}$  (Fazzari *et al.*, 2014). Desta forma, tanto o azeite como as azeitonas e o nitrato presente em vegetais, alimentos típicos da dieta mediterrânea, poderão ser uma fonte de  $\text{NO}_2\text{-FA}$  no estômago humano.

Curiosamente, a maior parte do cLA também é obtido a partir da dieta, nomeadamente da carne proveniente de ruminantes. Além disso, existem também vários suplementos fabricados a partir do óleo de girassol e de cártamo, que contêm uma mistura dos isómeros cis-9, trans-11 e trans-10, cis-12. (Shen e McIntosh, 2016). Como já foi referido anteriormente para os ácidos gordos poli-insaturados no geral, o cLA é o substrato preferencial para a nitração, quando comparado com o ácido linoleico bis-alílico, devido à sua maior reatividade (Bonacci *et al.*, 2012). O  $\text{NO}_2\text{-cLA}$  está presente no plasma e na urina de indivíduos saudáveis, verificando-se concentrações superiores nos tecidos quando existe um insulto inflamatório (Delmastro-Greenwood *et al.*, 2015). O estudo realizado por Delmastro *et al.* (2015) com o objetivo de saber qual o contributo da dieta para a formação de  $\text{NO}_2\text{-cLA}$  mostrou, através da administração oral concomitante em indivíduos saudáveis de espécies de azoto marcadas e suplementos de cLA, que a presença deste último a nível gástrico é um fator limitante para a formação do ácido gordo nitrado correspondente. Desta forma, os níveis de  $\text{NO}_2\text{-cLA}$  foram aumentados pela administração do suplemento aquando do nitrato (Delmastro-Greenwood *et al.*, 2015).

Por outro lado, sabendo que a administração quer de nitrito, quer de nitrato induz a formação de  $\cdot\text{NO}$  e este, por sua vez, é responsável por diversos efeitos biológicos, incluindo

a inibição da função plaquetar, foi avaliado de que forma a presença de cLA influencia este processo. Constatou-se que a administração simultânea destes compostos promove a diminuição dos níveis de desoxi-hemoglobina, favorecendo a ativação das plaquetas. Com isto, conclui-se que a co-administração em causa irá permitir que o  $\cdot\text{NO}$  seja desviado para outras vias, nomeadamente a formação de  $\text{NO}_2\text{-cLA}$ . Desta forma, as respostas biológicas derivadas da ingestão de nitrato e, conseqüentemente, do aumento das concentrações de  $\cdot\text{NO}$ , são bastante influenciadas pelo cLA proveniente da dieta (Hughan *et al.*, 2017).

#### **4. Propriedades químicas, metabolismo e distribuição dos ácidos gordos nitrados**

As propriedades químicas dos  $\text{NO}_2\text{-FA}$  são responsáveis pelo seu comportamento nas diferentes situações fisiológicas, bem como pelos seus efeitos biológicos e, desta forma, torna-se essencial conhecê-las. A estabilidade destas moléculas em meio aquoso é distinta da que é apresentada em meio lipofílico, sendo bastante estáveis neste último, mas decompondo-se em solução aquosa e levando à formação de  $\cdot\text{NO}$  (Trostchansky e Rubbo, 2008) (Ferreira *et al.*, 2012). Os dados obtidos a partir do  $\text{NO}_2\text{-LA}$  confirmam estes resultados, uma vez que se verificou uma semi-vida de 30 a 60 minutos em solução aquosa, decaimento este que foi inibido quando aplicado em lipossomas. Isto demonstra a estabilidade deste ácido gordo nitrado em meio lipofílico, bem como a possibilidade de se poder concentrar endogenamente em lipoproteínas ou membranas celulares. Neste caso, a ação das esterases ou das fosfolipases levarão à sua libertação em condições inflamatórias, activando as vias de sinalização que serão detalhadas no próximo capítulo (Schopfer *et al.*, 2005) (Ferreira *et al.*, 2012). Existem várias teorias para justificar o decaimento destas espécies em meio aquoso e posterior formação de  $\cdot\text{NO}$ , sendo uma delas a ocorrência da reação de Nef modificada, proposta por Schopfer *et al.* (Schopfer *et al.*, 2005). A capacidade que os nitroalcenos têm para libertar  $\cdot\text{NO}$ , apesar de em baixas concentrações, permite-lhe mediar processos de sinalização celular dependentes do cGMP (Batthyany *et al.*, 2006) (Rom *et al.*, 2018).

A característica química mais importante dos  $\text{NO}_2\text{-FA}$  consiste na sua natureza eletrofílica, conferida pelo grupo nitroalceno, e que é responsável por efeitos de sinalização celular independentes de cGMP. O  $-\text{NO}_2$  é um substituinte com uma capacidade elevada de retirar eletrões, o que irá promover a reação reversível de nitroalquilação (*via* adição de Michael) com aminoácidos nucleofílicos, como é o caso da cisteína (cys), lisina e histidina. A adição à cisteína será posteriormente responsável por modificações pós-tradução (PTM), o que poderá levar a alterações na estrutura ou função das proteínas (Ferreira *et al.*, 2012) (Freeman, O'Donnell e Schopfer, 2018).

Por outro lado, no caso específico do NO<sub>2</sub>-AO, este poderá originar metabolitos não eletrófilos que serão incorporados em triglicerídeos (TG), sendo assim, metabolitos inativos. Também poderá ocorrer a esterificação deste composto em monoglicerídeos (MG) e diglicerídeos (DG), originando um depósito de lípidos potencialmente bioativos que, por sua vez, poderão armazenar e libertar mediadores de sinalização aquando de uma resposta inflamatória (Buchan *et al.*, 2018).

## **5. Sinalização celular mediada pelos ácidos gordos nitrados**

Devido às características descritas no capítulo anterior, os NO<sub>2</sub>-FA têm a capacidade de interferir com diversas vias de sinalização intracelulares importantes, o que será determinante para as suas propriedades protetoras em diferentes patologias. As vias de sinalização do NF-κB, do *Peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR), do *Nuclear Factor E2-related factor 2* (Nrf2) e do *Heat shock factor 1* (HSF-1) são moduladas pelos ácidos gordos nitrados. Assim, estas espécies são capazes de influenciar a resposta anti-inflamatória, bem como permitir a homeostasia da glicose e dos lípidos.

### **5.1 Regulação da via de sinalização do NF-κB**

A interação dos NO<sub>2</sub>-FA com resíduos de cys é determinante para a ação anti-inflamatória exercida através da inibição do NF-κB, que consiste num complexo proteico que atua como fator de transcrição e que pode ser ativado através de vários estímulos. Esta via de sinalização começa pela ligação de uma molécula ao recetor que, ao ser ativado, levará à fosforilação da cinase do IκB (IKK) e consequente ativação. Por sua vez, esta irá fosforilar o Inibidor da κB (IκBα) – presente no plasma e responsável pela inibição do NF-κB – provocando a sua posterior ubiquitinação. Desta forma, o NF-κB desloca-se para o núcleo, ocorrendo a transcrição dos genes e a expressão de proteínas que desempenham diferentes funções em vários processos, nomeadamente enzimas pro-inflamatórias, moléculas de adesão celular, citocinas e proteínas de fase aguda (Lawrence, 2009) (Freeman *et al.*, 2017).

Ao longo dos últimos anos, vários estudos demonstraram que os NO<sub>2</sub>-FA atuam nesta via de sinalização de diversas formas, tendo como resultado final a inibição da transcrição dos genes-alvo do NF-κB. De facto, a alquilação covalente realizada por estas moléculas mostrou ser um dos fatores responsáveis pela regulação negativa do fator de transcrição em causa, ocorrendo nos resíduos de cys altamente conservados do domínio p65 do NF-κB, impossibilitando a ligação com o DNA (Freeman *et al.*, 2017) (Rubbo, 2013). Neste sentido, num estudo *in vivo* e *in vitro* realizado por Luis Villacorta *et al.* (Villacorta *et al.*, 2013) em



murganhos e em macrófagos isolados utilizando o LPS como estímulo, foi revelada a importância dos produtos da nitração de ácidos gordos para a redução da inflamação e, posteriormente, como protetores cardiovasculares. Verificou-se assim que os NO<sub>2</sub>-FA inibem a ativação do NF-κB, e a adesão de leucócitos *in vivo*. Além disso, o NO<sub>2</sub>-FA em questão comprometeu a fosforilação de IKK e de IκB (prevenindo a degradação do IκB), bem como a ubiquitinação deste inibidor em macrófagos isolados.

Finalmente, foram comparadas as propriedades anti-inflamatórias dos NO<sub>2</sub>-FA obtidas através da inibição desta via com as de outros inibidores conhecidos, como é o caso da metil bardoxolona (CDDO-Me). Este composto tem a capacidade de inibir a via de sinalização em questão através da interação com o resíduo de cys durante a ativação do IKKβ (Rom *et al.*, 2018). Como inibidor, mostrou ter bastantes benefícios, no entanto não tinha um nível de segurança adequado (Zeeuw, de *et al.*, 2013). Por outro lado, tendo em conta a formação endógena dos NO<sub>2</sub>-FA, estes terão vantagens no que toca à segurança e, além disso, mostraram ser mais eficazes na inibição (Rom *et al.*, 2018).

## **5.2 Ativação diferencial dos PPARs**

Os PPARs são recetores nucleares (NRs) que fazem parte de uma superfamília de fatores de transcrição capazes de regular a expressão de genes envolvidos no metabolismo de lípidos e da glicose, bem como no processo de inflamação. Nos mamíferos estão presentes três subtipos: PPARα, PPARβ e PPARγ, com as sequências de aminoácidos extremamente conservadas. Este último tem duas isoformas funcionais, PPARγ1 e PPARγ2, sendo estas expressas em vários tecidos - no caso do PPARγ1 - ou quase restritas ao tecido adiposo - no caso do PPARγ2 (Ferreira *et al.*, 2012) (Wang, Dougherty e Danner, 2016). A activação do PPARγ pelos respetivos ligandos pode conduzir a duas alternativas de sinalização:

*I. Trans-ativação:* Esta via de sinalização implica a ligação do ligando ao PPARγ que se encontra na forma inativa no heterodímero PPARγ-RXR, promovendo o recrutamento de co-ativadores e a dissociação dos co-repressores, permitindo assim a ativação do heterodímero. Desta forma, será estimulada a transcrição dos genes-alvo através da ligação ao gene promotor PPRE. Os genes cuja transcrição é induzida pelo PPARγ codificam proteínas envolvidas na regulação da glicose e na diferenciação de adipócitos (Ferreira *et al.*, 2012) (Ahmadian *et al.*, 2013) (Wang, Dougherty e Danner, 2016).

*II. Trans-repressão:* Alternativamente, o ligando poderá ser responsável pela inibição de outros genes, ao promover o acoplamento aos Pequenos Modificadores Similares à ubiquitina

(SUMO) e posterior recrutamento para o complexo NF- $\kappa$ B, inibindo-o. Esta interação é, desta forma, responsável pela regulação da transcrição de genes pro-inflamatórios (Wang, Dougherty e Danner, 2016).

A interação entre os PPARs e os NO<sub>2</sub>-FA mostrou que o NO<sub>2</sub>-FA regula a expressão dos genes-alvo do PPAR (Schopfer *et al.*, 2005). Dadas as suas propriedades eletrofílicas, ácidos gordos nitrados atuam como ligandos endógenos dos PPARs, sendo verificada uma atividade potente a concentrações fisiológicas. Neste contexto, foi testada a afinidade dos NO<sub>2</sub>-FA para os diferentes subtipos de PPARs, onde se constatou que a atividade foi mais significativa no caso do PPAR $\gamma$ , sendo necessário o triplo da concentração nos outros subtipos para obter a mesma extensão de ativação (Baker *et al.*, 2005) (Rubbo, 2013) (Ferreira *et al.*, 2012). A ativação por parte do NO<sub>2</sub>-OA mostrou ser importante, uma vez que este é mais estável em meio aquoso, verificando-se menor decaimento do que no caso do LA-NO<sub>2</sub>. No entanto, ambos são capazes de induzir a diferenciação de adipócitos de forma eficiente, ao contrário dos respetivos ácidos gordos nativos. O comportamento apresentado em ensaios de transfeção com luciferase foi similar ao dos agonistas totais do PPAR $\gamma$ , como é o caso da rosiglitazona (RZD) e mais potente do que os agonistas parciais, sendo esta potência dependente dos regioisómeros utilizados (Ferreira *et al.*, 2012) (Wang, Dougherty e Danner, 2016) (Schopfer *et al.*, 2005).

O domínio de ligação do PPAR $\gamma$  é bastante largo, permitindo assim uma interação promissora com os lípidos. O resíduo Cys285 do domínio de ligação, com características nucleofílicas, é o alvo de ligação do NO<sub>2</sub>-FA através da adição de Michael, não havendo o recrutamento de co-ativadores durante o processo de ativação do PPAR $\gamma$  (Rom *et al.*, 2018).

O recetor *Scavenger* CD36 tem como promotor o PPRE, propriedade que foi utilizada para analisar a extensão de ativação do PPAR $\gamma$ . A síntese de mRNA deste recetor, bem como da sua síntese proteica, foram aumentadas em murinhos aos quais se administraram concentrações de NO<sub>2</sub>-LA na ordem dos micromolar (Schopfer *et al.*, 2005). No entanto, sendo este recetor aumentado pela via de sinalização Keap1/Nrf2, foi crucial a análise do papel desta via. Assim, os autores constataram que, no caso dos adipócitos, a sua diferenciação é inibida pela Keap1/Nrf2, pelo que é evidenciada uma interferência entre as duas vias. Desta forma, apesar dos ácidos gordos nitrados terem, no caso dos ensaios de transfeção, o comportamento de agonistas totais, a nível de diferenciação de adipócitos e acumulação de lípidos, os efeitos foram menos evidentes (Ferreira *et al.*, 2012).

A RZD é o fármaco de eleição para a comparação de efeitos, uma vez que se trata de um agonista total do PPAR $\gamma$ . Apesar dos seus benefícios a nível de regulação dos níveis de glicose, proporcionados pela sua elevada potência e seletividade, este foi relacionado com o aumento de problemas cardíacos na população que a utilizava como antidiabético. Por outro lado, as glitazonas estão associadas a um aumento de massa corporal. Estas propriedades fazem com que os NO<sub>2</sub>-FA sejam uma terapia promissora, uma vez que são capazes de aumentar a sensibilidade à insulina sem que ocorra aumento significativo de peso. Curiosamente, este aumento de peso parece estar associado à ativação de PPAR $\gamma$  a nível cerebral e não a nível adiposo. Ao contrário do que acontece com os NO<sub>2</sub>-FA, estes agonistas ligam-se ao recetor GPR40 que, além de ser essencial na propagação da sinalização genómica de PPAR $\gamma$ , pode ativar a ERK1/2. Esta cinase é pro-inflamatória e fosforila diretamente o PPAR $\gamma$ , inativando-o. Assim, o objetivo deverá ser a utilização de ligandos que sejam potentes na ativação, sem haver a ligação ao GPR40 e, desta forma, evitando efeitos adversos associados (Wang, Dougherty e Danner, 2016) (Rom *et al.*, 2018).

### **5.3. Impacto na transcrição de genes dependentes do Nrf2**

O Nrf2 é uma proteína longa constituída por sete regiões altamente conservadas, designados como domínios Neh (*NRF2-ECH homology*), tendo cada um deles um papel nas diferentes funções desempenhadas pelo Nrf2. De um modo geral, esta proteína é um fator de transcrição codificado pelo gene NFE2L2, sendo um dos responsáveis pelo controlo do processo anti-inflamatório, uma vez que regula a expressão de genes envolvidos na defesa perante *stress* oxidativo (Deen *et al.*, 2018) (Khoo *et al.*, 2018) (Ahmed *et al.*, 2017). Em condições basais, este fator encontra-se ligado à *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1), que funciona como regulador negativo, sendo que esta associação é responsável pelo estado inativo do Nrf2. A Keap1 é uma proteína que leva à degradação deste fator nuclear, promovendo a sua ubiquitinação e consequente degradação pelo proteossoma. Verifica-se assim que, nestas condições, a transcrição dos genes promovida pelo Nrf2 está inibida (Rubbo, 2013)(Deen *et al.*, 2018) (Khoo *et al.*, 2018) (Ahmed *et al.*, 2017).

A ativação do Nrf2 pode ser estimulada em condições de *stress* oxidativo. As condições de *stress* em questão permitem que a forma inativa presente no citoplasma se separe do Keap1 (devido à modificação de resíduos específicos de cys), prevenindo a sua ubiquitinação e permitindo que migre para o núcleo e se ligue ao ARE do DNA, levando à expressão de enzimas de fase II (Rubbo, 2013) (Ahmed *et al.*, 2017). Os lípidos eletrófilos são ativadores importantes do Nrf2. Uma das características importantes na Keap1 é a elevada quantidade

de resíduos de cisteína, destacando-se três deles devido à sua ligação com a regulação dos genes por eletrófilos: Cys151, Cys273 e Cys288. Destes, o primeiro tem sido utilizado como alvo dos fármacos ativadores, nomeadamente a metil-bardoxolona que se liga preferencialmente a este resíduo. Desta forma, a estabilização do complexo Keap1/Nrf2, acumulação do Nrf2 no núcleo e posterior transcrição dos genes-alvo são potenciadas (Suzuki, Motohashi e Yamamoto, 2013) (Rubbo, 2013) (Deen *et al.*, 2018).

Os NO<sub>2</sub>-FA estimulam significativamente a expressão dos genes dependentes do Nrf2 (Rubbo, 2013). As primeiras referências da interação dos nitroalcenos com esta via de sinalização mostraram que o NO<sub>2</sub>-AL estabiliza o Nrf2, com consequente ativação do ARE (Villacorta *et al.*, 2007). Como potentes espécies eletrófilas, mais uma vez os NO<sub>2</sub>-FA ligam a resíduos de cisteína, formando aductos covalentes (Khoo *et al.*, 2018). Em contraste com os fármacos mencionados anteriormente, os NO<sub>2</sub>-FA são ativadores de Nrf2 independentes do Cys151, tendo como alvos os resíduos Cys273 e Cys288 (Kansanen *et al.*, 2011)(Deen *et al.*, 2018). Por outro lado, o aumento da expressão dos genes dependentes de Nrf2 por nitroalcenos induz a produção da Heme Oxigenase-I (HO-1) que tem, igualmente, funções anti-inflamatórias (Deen *et al.*, 2018).

Em suma, tendo em conta os efeitos da via de sinalização Keap1/Nrf2/ARE e a indução desta por parte dos diferentes NO<sub>2</sub>-FA, esta via é vista como sendo, em parte, responsável pelos efeitos anti-inflamatórios destes compostos e, por isso, pelo seu efeito protetor e potencial poder terapêutico em diferentes patologias.

#### **5.4 Indução da transcrição pelo HSF-1**

O HSF-1 é um fator de transcrição envolvido na homeostasia celular, destacando-se as suas funções em situações de *stress*, como é o caso do choque térmico (situações na qual existem danos nas proteínas celulares), uma vez que este leva à formação de proteínas que degradam ou reparam as proteínas danificadas (Dayalan Naidu e Dinkova-Kostova, 2017). Em condições basais este fator encontra-se no citoplasma, ligado a um complexo de inibição onde estão inseridas as chaperonas HSP40, HSP70 e HSP90. Quando célula é sujeita a condições de *stress*, o HSF-1 é ativado, resultando na sua deslocação para o núcleo. A ligação deste fator aos Elementos de Choque Térmico (HSE), encontrados nas regiões de regulação dos genes HSP, leva à transcrição de diferentes genes, que codificam proteínas responsáveis pela Resposta ao Choque Térmico (HSR). As proteínas sintetizadas são denominadas de Proteínas de Choque Térmico (HSPs) e têm funções cruciais na homeostasia proteica, como é o caso das Chaperonas que ajudam no enrolamento das proteínas. Este mecanismo está presente em

todas as células em condições basais, no entanto, quando sujeito a qualquer tipo de *stress*, é verificada uma sobreexpressão destas HSPs (Vihervaara e Sistonen, 2014) (Dayalan Naidu e Dinkova-Kostova, 2017) (Deen *et al.*, 2018).

A presença de resíduos de cisteína na HSP70 e HSP90 representa um alvo importante para os NO<sub>2</sub>-FA e outras espécies eletrófilas. Como foi referido anteriormente, estas duas HSPs (chaperonas) estão integradas no complexo de inibição do HSF-1 e, devido às suas características nucleofílicas, ocorrerá a adução com os NO<sub>2</sub>-FA e posterior separação do complexo ao fator, permitindo, assim, a expressão dos genes por ele regulados. Desta forma, conclui-se que os NO<sub>2</sub>-FA têm a capacidade de induzir a transcrição pelo HSF-1, ajudando na homeostasia proteica. Por outro lado, verifica-se que as HSPs limitam a ativação do NF-κB, mostrando assim um caráter anti-inflamatório relevante (Deen *et al.*, 2018) (Kansanen *et al.*, 2009). A ativação da HSR revelou ser a via que é maioritariamente ativada pelos NO<sub>2</sub>-FA nas células endoteliais humanas (Kansanen *et al.*, 2009).

## **6. Potencial farmacológico dos ácidos gordos nitrados**

A modulação das vias de sinalização referidas anteriormente demonstra que os NO<sub>2</sub>-FA são responsáveis por diversos mecanismos protetores e, desta forma, revelam ter potencial terapêutico. Em suma, pode-se afirmar que, além das suas propriedades únicas, os NO<sub>2</sub>-FA têm características de três classes de candidatos não convencionais a fármacos:

*I. Ácidos gordos:* Os ácidos gordos podem ser aplicados em três abordagens farmacológicas. Uma delas, centra-se nos ómega-3, que possuem efeitos protetores em doenças cardiovasculares, contudo, apresentam importantes limitações tais como a necessidade de utilizar quantidades muito elevadas. Outro exemplo são os ácidos gordos protegidos da beta-oxidação. Estes, tal como o nome indica, estão protegidos contra as reações de beta-oxidação, o que implica um maior tempo de semivida e, assim, a necessidade de doses mais baixas. Por fim, os ácidos gordos oxidados, sintetizados endogenamente, que também são caracterizados por serem menos metabolizados ou seja, as doses a utilizar são significativamente inferiores às dos ómega-3 (Caterina, De, 2010) (Schopfer *et al.*, 2018).

*II. Intermediários metabólicos:* Alguns intermediários metabólicos mostraram ter ações farmacológicas relevantes. O Fumarato Dimetil (DMF) é um dos exemplos que teve sucesso no tratamento da psoríase, tendo um bom perfil de segurança. Sendo uma molécula eletrófila, o DMF exerce as suas ações através da ativação da expressão de genes dependentes do Nrf2, por adição de Michael (Schopfer *et al.*, 2018).

*III. Moléculas eletrófilas:* A característica destas moléculas, comum aos NO<sub>2</sub>-FA, é a natureza eletrofílica. Estas são um grupo de compostos que ora ocorrem naturalmente ora são sintetizadas quimicamente. Um dos exemplos é a CDDO-Me, que é capaz de ativar os genes dependentes do Nrf2 em concentrações na ordem dos nanomolar. Apesar de os doentes apresentarem uma melhoria na função renal em ensaios clínicos de Fase II, a sua aplicação em ensaios de Fase III demonstrou um elevado risco de eventos cardiovasculares (Zeeuw, de et al., 2013) (Schopfer et al., 2018).

Como já foi mencionado antes, muitas das propriedades são características comuns aos NO<sub>2</sub>-FA, no entanto, estes apresentam algumas vantagens importantes. Por exemplo, a beta-oxidação que, nos compostos atrás referidos conduz à inibição da atividade das respectivas moléculas-mãe, nos NO<sub>2</sub>-FA dá origem a metabolitos que têm maior facilidade de atingir os alvos, bem como uma eletrofilicidade superior (Schopfer et al., 2018).

Durante as últimas décadas, os NO<sub>2</sub>-FA mostraram ter benefícios importantes a nível metabólico (nomeadamente na homeostasia da glicose e dos lípidos) e também lhes foram atribuídas ações anti-inflamatórias através da regulação de diversas vias de sinalização, como foi demonstrado anteriormente (Rom et al., 2018). Assim, as propriedades pleiotrópicas destes compostos atraíram a atenção de diversos grupos de investigação. Vários estudos mostram que, devido aos seus mecanismos de ação, os NO<sub>2</sub>-FA poderão ser utilizados no tratamento de diversas doenças, como é o caso da esteatose hepática (Khoo et al., 2019), doença renal crónica e aguda (Jobbagy e Tan, 2018), cancro da mama triplo positivo (Chen Woodcock et al., 2018), e doenças cardiovasculares (Mollenhauer, Mehrkens e Rudolph, 2018).

### **6.1 Ácidos gordos nitrados na esteatose hepática**

A doença do fígado gordo não alcoólico (NAFLD) é a doença hepática crónica com maior prevalência, estando diretamente associada à obesidade e à resistência à insulina (Bedossa, 2017). O facto de ser silenciosa do ponto de vista da sintomatologia, bem como de a obesidade ser um dos problemas de saúde pública mais prevalentes, faz com que esta doença seja subdiagnosticada. Apesar da ausência inicial de sintomas, a esteatose hepática pode evoluir para um estado inflamatório crónico, conduzindo a uma esteato-hepatite não alcoólica (NASH), que representa um grau mais avançado da doença. Com a progressão da doença, surge fibrose, com posterior cirrose, que poderá resultar num carcinoma hepatocelular, falência hepática e, inclusivamente, morte (Khoo et al., 2019).

O tratamento baseia-se em medidas não farmacológicas, nomeadamente o aumento de atividade física com consequente diminuição de sedentarismo e alterações na dieta. Esta

abordagem tem resultados limitados, sendo necessária terapêutica medicamentosa que, atualmente, ainda não está aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA). As glitazonas constituem os fármacos testados mais promissores, uma vez que são responsáveis pela diminuição da resistência à insulina e reduzem a esteatose. Apesar dos seus efeitos benéficos, como já foi dito anteriormente, estas estão associadas a diversos efeitos adversos, tais como aumento de peso e, no caso concreto da RGZ, aumento do risco de eventos cardiovasculares, pelo que a necessidade de uma abordagem diferente é cada vez premente (Ratziu, 2013) (Khoo et al., 2019). Os NO<sub>2</sub>-FA são fortes candidatos como possíveis fármacos, uma vez que atuam em várias vias de sinalização, tendo benefícios importantes na inflamação e no *stress* oxidativo (fatores de risco de NASH). Num estudo de Khoo et al. (2019) com o objetivo de saber se o NO<sub>2</sub>-OA atenua a esteatose hepática induzida por obesidade (causada por uma dieta rica em gordura), foram comparados os efeitos deste NO<sub>2</sub>-FA com o fármaco de eleição, RGZ (Khoo et al., 2019). Os resultados dividiram-se em várias vertentes: efeitos no aumento de peso e massa gorda, efeitos na tolerância à glicose, efeitos na dislipidemia e acumulação de triglicéridos no fígado, bem como efeito na função mitocondrial. Sendo o aumento de peso um dos efeitos secundários mais prevalentes da RGZ, o facto do NO<sub>2</sub>-OA não induzir aumento ponderal é uma vantagem significativa a nível terapêutico. Este NO<sub>2</sub>-FA é também responsável por melhorias na intolerância à glicose, sendo os valores da glicémia reduzidos de forma significativa. A nível lipídico, verificou-se uma diminuição dos TG na circulação sanguínea aquando do tratamento com NO<sub>2</sub>-OA, bem como uma diminuição da sua acumulação no fígado, ao contrário do que aconteceu com a RGZ, em que os TG hepáticos se encontravam significativamente aumentados. Por fim, estando a obesidade e a resistência à insulina relacionadas com a disfunção mitocondrial, também a função destes organitos foi avaliada a nível hepático, sendo que o NO<sub>2</sub>-OA foi responsável por uma melhoria significativa no processo de respiração mitocondrial (Khoo et al., 2019). Assim, conclui-se que, apesar da RGZ melhorar a resistência à insulina, esta não protege contra a esteatose hepática e que, avaliando os efeitos do NO<sub>2</sub>-OA na acumulação de TG no fígado, os NO<sub>2</sub>-FA poderão ser agentes terapêuticos importantes nesta doença, com a vantagem de não apresentar os efeitos secundários das TZD (Khoo et al., 2019).

## **6.2. Ácidos gordos nitrados na doença renal**

Os rins são órgãos vitais cuja principal função é a manutenção da homeostasia dos fluidos corporais, assegurando que a osmolaridade, composição iónica e pH se mantêm em valores fisiológicos. Por outro lado, sendo órgãos excretores, são cruciais na excreção de toxinas e outras substâncias nefastas para o organismo. Estes processos são possíveis devido

à sua estrutura anátomo-patológica, sendo formados por inúmeros nefrônios que permitem a filtração do sangue e a excreção. As doenças renais são um problema clínico com grande prevalência, com morbidade e mortalidade significativas e, do ponto de vista clínico, podem ser divididas em doenças renais agudas e doenças renais crônicas. O desequilíbrio redox (excesso de espécies de oxidação por produção excessiva ou escassez de eliminação) e a inflamação são os mecanismos centrais na fisiopatologia da doença renal. As espécies reativas de oxigênio são responsáveis por danos celulares e tecidulares significativos e ativam vias de sinalização pro-inflamatórias (incluindo NF- $\kappa$ B). Por sua vez, a inflamação encontra-se diretamente relacionada com a perda da função renal uma vez que as células inflamatórias contribuem para a fibrose tecidual (Borthwick, Wynn e Fisher, 2013) (Jobbagy e Tan, 2018).

Neste contexto, os NO<sub>2</sub>-FA têm sido estudados para o tratamento destas doenças devido à sua capacidade de modular diversas vias de sinalização, tais como a do NF- $\kappa$ B e Nrf2, conferindo-lhes propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Além disso, a diminuição do stress oxidativo responsável pelo aumento da expressão de proteínas de choque térmico induzido pelos NO<sub>2</sub>-FA, apoia as expectativas de uma melhoria no prognóstico da doença renal (Kansanen *et al.*, 2009) (Jobbagy e Tan, 2018) (Arbeeny *et al.*, 2019).

### *I. Doença renal aguda*

As doenças renais agudas são iniciadas por múltiplos fatores, sendo a isquemia e a sépsis as principais causas. Estas são definidas por uma interrupção repentina da função renal e podem ou não evoluir para doença renal crônica, dependendo da severidade e/ou rapidez do tratamento (Wang, Li e Yang, 2015) (Jobbagy e Tan, 2018).

O tratamento com NO<sub>2</sub>-OA em modelos experimentais de isquemia foi responsável por melhorias em marcadores da função renal bem como pela diminuição da expressão da NADPH oxidase (NOX) e de citocinas pro-inflamatórias. Além disso, em modelos de sépsis induzidos pelo Lipopolissacarídeo S (LPS), a libertação de citocinas e isquemia são inibidas pela administração de NO<sub>2</sub>-FA. Em concreto, o NO<sub>2</sub>-OA melhora a hipotensão causada pela disfunção cardiovascular (induzido pelo LPS) reduzindo, assim, a isquemia renal. Todos os efeitos benéficos observados são baseados nos mecanismos atrás apresentados, nomeadamente a ativação do Nrf2 e regulação positiva das HSPs (Jobbagy e Tan, 2018).

### *II. Doença renal crónica*

A doença renal crónica resulta de condições existentes durante um longo período de tempo, como é o caso da diabetes ou hipertensão, e constitui a principal causa de doença



renal terminal. Existem diversos mecanismos que caracterizam esta doença, nomeadamente a inflamação crónica, o *stress* oxidativo e a desregulação de diversas vias de sinalização como a do NF-kB e a do Nrf2 (Jobbagy e Tan, 2018) (Arbeeny *et al.*, 2019).

O CXA-10 é um regioisómero específico do NO<sub>2</sub>-OA que se encontra em desenvolvimento clínico como potencial fármaco para o tratamento da doença renal crónica. É apresentado em duas formulações, sendo uma para administração intravenosa e outra para administração oral. Assim, como acontece com outros NO<sub>2</sub>-FA, as suas ações farmacológicas são baseadas em diversos mecanismos e interações moleculares, nomeadamente a adição à cys273 e cys288 do Keap1, a adição à cisteína na subunidade p65 do NF-kB, a ligação às HSP inibitórias do HSF-1 e a inibição da xantina oxidoreductase. O tratamento com doses baixas e com doses altas levou a diferentes resultados, tendo efeitos protetores na primeira mas não na segunda. Destaca-se a diminuição da razão peso renal/peso corporal, a diminuição de albumina e de nefrina na urina e uma diminuição do dano glomerular. Em relação aos biomarcadores de inflamação (MPC-1) e de fibrose (fibronectina e colagénio III), também estes se encontraram com níveis mais baixos no caso de tratamento com doses baixas de CXA-10 (Schopfer *et al.*, 2018) (Arbeeny *et al.*, 2019).

Desta forma, foi demonstrado que o CXA-10 é renoprotetor nos modelos de doença renal crónica, exercendo outros efeitos sistémicos benéficos e, por isso, pode ser utilizado no tratamento deste tipo de patologias onde estão presentes níveis elevados de *stress* oxidativo, inflamação e/ou fibrose.

### **6.3. Ácidos gordos nitrados no cancro da mama triplo negativo**

O cancro da mama triplo negativo é um subtipo de cancro da mama, representando 10% dos casos, cujo fenótipo é bastante mais agressivo. É caracterizado pela ausência de recetores de estrogénio (RE) e de progesterona (RP), bem como pela diminuição dos recetores de tirosina cinase ERB2 (HER2) inviabilizando assim, terapêutica direccionada a estes alvos. Os tratamentos convencionais, como é o caso da quimioterapia e radioterapia, têm mostrado ser pouco eficazes neste caso e, após a realização destes, a recorrência é mais frequente e bastante mais agressiva. Assim, a descoberta de novas terapias para o tratamento este tipo de carcinoma tem sido um desafio para a comunidade científica (Dent *et al.*, 2007) (Marques, 2003) (Chen Woodcock *et al.*, 2018).

A ativação do NF-kB e a presença da citocina pro-inflamatória TNF $\alpha$  estão associadas ao desenvolvimento e à progressão do cancro da mama triplo negativo. Verificou-se que a

invasão local e a metastização são facilitadas pelo  $\text{TNF}\alpha$ , pela expressão de moléculas de adesão e pela actuação de enzimas de degradação da matriz extracelular, sendo a activação da via de sinalização do NF-kB um evento central. Os efeitos do  $\text{NO}_2\text{-OA}$  no cancro da mama triplo negativo foram analisados devido ao seu impacto na via de sinalização do NF-kB, nomeadamente a inibição dos inibidores do fator, que são responsáveis por levar à sua posterior degradação, inibição da ligação ao DNA e promoção da degradação proteossómica (Qiao *et al.*, 2016) (Chen Woodcock *et al.*, 2018). Os resultados obtidos por Woodcock *et al.* (2018) foram concordantes com os mecanismos que o  $\text{NO}_2\text{-OA}$  tem na via de sinalização do NF-kB. Desta forma, observaram que este  $\text{NO}_2\text{-FA}$  inibe o crescimento e a viabilidade das células de cancro da mama triplo negativo, tanto *in vitro* como *in vivo*, através da inibição da via de sinalização do NF-kB, mas também impedindo a metastização por redução da expressão de proteínas de adesão tais como a ICAM-1 e uPA. Curiosamente, o  $\text{NO}_2\text{-OA}$  afecta especificamente as células tumorais, não exercendo os mesmos efeitos em células saudáveis. Uma justificação para este efeito, pode-se dever ao facto das células tumorais possuírem uma menor concentração de glutatião (GSH), o qual, quando presente, é o alvo primário para alquilação, formando-se  $\text{NO}_2\text{-AO-SG}$ . Este é rapidamente transportado para fora da célula e assim, não ocorrerá reação intracelular com as proteínas-alvo (Chen Woodcock *et al.*, 2018).

Desta forma, foram demonstradas as propriedades anticancerígenas do  $\text{NO}_2\text{-OA}$ , sendo um potencial fármaco como terapia seletiva no tratamento do cancro da mama triplo negativo.

#### **6.4. Ácidos gordos nitrados na aterosclerose**

A aterosclerose é uma doença crónica inflamatória das artérias que está na base de outras doenças arteriais, nomeadamente a hipertensão arterial. Existem diversos fatores de risco (e.g., sedentarismo, hábitos tabágicos, diabetes) que levam à baixa biodisponibilidade de  $\text{NO}$  e conseqüente migração de monócitos para o espaço subendotelial que se diferenciam em macrófagos. A posterior acumulação de lípidos é responsável pela formação de células espumosas a partir dos macrófagos e, assim, surgem as estrias gordurosas e, mais tarde, placas fibrosas (Singh *et al.*, 2002) (Mollenhauer, Mehrkens e Rudolph, 2018).

Um correto funcionamento fisiológico endotelial depende da biodisponibilidade de  $\text{NO}$ , o que pode ser providenciado pelo  $\text{NO}_2\text{-OA}$ , uma vez que é responsável pelo aumento da expressão da eNOS e da HO-1, levando, assim, à manutenção da função e produção de  $\text{NO}$  (Khoo *et al.*, 2010). Ainda a nível da disfunção endotelial característica desta doença, o  $\text{NO}_2\text{-OA}$  é capaz, *in vitro*, de inibir a ativação do NF-kB mediada pelo TLR4, reduzindo assim

a libertação de citocinas pro-inflamatórias (Sprague e Khalil, 2009)(Villacorta *et al.*, 2013) (Mollenhauer, Mehrkens e Rudolph, 2018). Os NO<sub>2</sub>-OA são também responsáveis, através da ativação de PPAR  $\gamma$ , pela presença do fenótipo anti-inflamatório de monócitos (M2-like), inibindo assim a formação do fenótipo pro-inflamatório encontrado na fisiopatologia da aterosclerose. Além disso, nas lesões ateroscleróticas, está descrita uma deficiência na ativação de Nrf2, conduzindo ao aumento de células espumosas. Também neste evento os NO<sub>2</sub>-OA poderão ter um efeito relevante pois, ao activar o Nrf2, exercem um efeito anti-inflamatório e, portanto, desempenham propriedades anti-aterogénicas (Bouhleb *et al.*, 2007) (Mollenhauer, Mehrkens e Rudolph, 2018).

No que diz respeito ao tratamento, a angioplastia é uma terapia cirúrgica frequentemente utilizada. Contudo, em muitos casos, verifica-se uma reestenose pouco tempo após a intervenção. A reestenose consiste no reaparecimento da obstrução devido a uma hipertrofia das células musculares lisas que proliferam exageradamente. Esta hipertrofia na camada mais interna das artérias é significativamente reduzida pela administração de NO<sub>2</sub>-OA em murganhos, devido ao aumento da expressão de HO-1 que tem atividade antioxidante e anti-proliferativa. Estes efeitos são contrariados *in vivo* pela redução da apoptose verificada devido à presença de Nrf2, no entanto, sabe-se que a atividade do HO-1 é mais predominante e excede os efeitos contrários (Cole *et al.*, 2009) (Mollenhauer, Mehrkens e Rudolph, 2018).

Em suma, os NO<sub>2</sub>-FA, nomeadamente o NO<sub>2</sub>-OA, têm influência nas vias de sinalização que estão presentes na fisiopatologia da aterosclerose e, por isso, poderá ser um potencial candidato para tratamento.

## 7. Conclusão

Os NO<sub>2</sub>-FA constituem um tema que tem sido amplamente investigado e tem mostrado uma enorme evolução nas últimas décadas, tendo sido demonstradas propriedades únicas e relevantes em vários níveis, nomeadamente as suas propriedades eletrofílicas, que permitem a reacção com nucleófilos e, desta forma, a modulação de vias de sinalização celular.

A modificação através da reacção de nitração de ácidos gordos presentes endogenamente, ingeridos através da dieta ou até administrados oralmente é responsável pela formação de NO<sub>2</sub>-FA. Ainda que sejam propostos diversos mecanismos para estas reacções, ainda não existem estudos conclusivos, isto é, apesar de serem cientificamente corretos, nenhum dos mecanismos foi amplamente aceite, sendo necessário o estudo mais aprofundado neste ponto de modo a se obter uma compreensão total das moléculas formadas e da sua origem.

A dieta mediterrânea é responsável pelo fornecimento de nitrato e ácidos gordos insaturados, os quais são os compostos essenciais para a formação de NO<sub>2</sub>-FA. Além disso, esta dieta é também fonte directa de NO<sub>2</sub>-FA através do consumo de alimentos tais como azeite e azeitonas. Sendo dotados de propriedade anti-inflamatórias e reguladoras do metabolismo, NO<sub>2</sub>-FA encontram-se em fase de estudo para posterior utilização no tratamento de várias doenças inflamatórias e metabólicas. Assim, o aumento da quantidade destas espécies nitradas induzido pela dieta mediterrânea poderá estar relacionada com a diminuição da incidência e/ou gravidade destas patologias, devendo ser realizados posteriormente estudos mais focados nesta associação.

Sabe-se também que após a sua formação endógena, os NO<sub>2</sub>-FA poderão ser metabolizados, dando origem a diversos metabolitos que ainda não se encontram totalmente caracterizados e quantificados. A existência destes metabolitos poderá ser responsável por efeitos indesejados ou, pelo contrário, pela potenciação dos efeitos existentes nos NO<sub>2</sub>-FA e, desta forma, é importante entender a sua formação bem como as suas funções a nível fisiológico e patológico.

Uma questão curiosa diz respeito à maioria dos estudos serem realizados com o NO<sub>2</sub>-OA (devido à sua elevada estabilidade em meio aquoso e lipídico) mas, curiosamente, o ácido oleico não ser o substrato preferencial para a nitração *in vivo*, uma vez que não se trata de um ácido gordo insaturado conjugado. Desta forma, será relevante a realização de mais estudos focados nos substratos preferenciais de nitração, uma vez que, no final, estes darão origem à maior parte dos derivados existentes.

Em síntese, os NO<sub>2</sub>-FA são compostos cujas propriedades lhes permitem o envolvimento em várias vias de sinalização, assumindo um caráter pleiotrópico. Desta forma, são considerados potenciais candidatos para formulações utilizadas em doenças inflamatórias e metabólicas que ainda não têm terapêutica personalizada para alvos específicos. No entanto, são necessários mais estudos para o total conhecimento destas moléculas, assegurando uma eficiência e segurança adequadas.

## 8. Referências Bibliográficas

AHMADIAN, M.; SUH, J.M.; HAH, N; LIDDLE, C.; ATKINS, A.R.; DOWNES, M.; EVANS, R.M. - **Ppar $\gamma$  signaling and metabolism: The good, the bad and the future.** *Nature Medicine*. 19,5 (2013) 557-566.

AHMED, S. M. U.; LUO, L.; NAMANI, A.; WANG, X. J.; TANG, X. - **Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation.** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 1863,2 (2017) 585-597.

ARBEENY, C. M.; LING, H.; SMITH, M. M.; O'BRIEN, S.; WAWERSIK, S.; LEDBETTER, S. R.; MCALEXANDER, A.; SCHOPFER, F.J.; WILLETTE, R.N.; Jorkasky, D. K. - **CXA-10, a Nitrated Fatty Acid, Is Renoprotective in Deoxycorticosterone Acetate-Salt Nephropathy.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 369,3 (2019) 503-510.

BAKER, P.R.S.; LIN, Y.; SCHOPFER, F.J.; WOODCOCK, S.R., GROEGER, A.L.; BATTHYANY, C.; SWEENEY, S.; LONG, M.H.; ILES, K.E.; BAKER, L.M.S; BRANCHAUD, B.P.; CHEN, Y.E.; FREEMAN, B. A. - **Fatty Acid Transduction of Nitric Oxide Signaling.** *Journal of Biological Chemistry*. 280,51 (2005) 42464-42475.

BATTHYANY, C.; SCHOPFER, F.J.; BAKER, P.R.S.; DURÁN, R.; BAKER, L.M.S.; HUANG, Y.; CERVENANSKY, C.; BRANCHAUD, B.P.; FREEMAN, B.A. - **Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo.** *Journal of Biological Chemistry*. 281,29 (2006) 20450-20463.

BEDOSSA, P. - **Pathology of non-alcoholic fatty liver disease.** *Liver International*. 37, Suppl.1 (2017) 85-89.

BONACCI, G.; BAKER, P.R.S.; SALVATORE, S.R.; SHORES, D.; KHOO, N.K.H.; KOENITZER, J.R.; VITTURI, D.A.; WOODCOCK, S.T; GOLIN-BISELLO, F.; COLE, M.P.; WATKINS, S.; CROIX C.S.; BATTYANY, C.I.; FREEMAN, B.A; SCHOPFER, F.J. - **Conjugated linoleic acid is a preferential substrate for fatty acid nitration.** *Journal of Biological Chemistry*. 287,53 (2012) 44071-44082.

BORTHWICK, L.A.; WYNN, T.A.; FISHER, A. J. - **Cytokine mediated tissue fibrosis.** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 1832,7 (2013) 1049-1060.

BOUHLEL, M.A.; DERUDAS, B.; RIGAMONTI, E.; DIÉVART, R.; BROZEK, J.; HAULON, S.; ZAWADZKI, C.; JUDE, B.; TORPIER, G.; MARX, N.; CHINETTI-GBAGUIDI, G. - **PPAR $\gamma$**

**Activation Primes Human Monocytes into Alternative M2 Macrophages with Anti-inflammatory Properties.** *Cell Metabolism.* 6,2 (2007) 137-143.

BUCHAN, G. J.; BONACCI, G.; FAZZARI, M.; SALVATORE, S.R.; WENDELL, G.S. - **Nitro-fatty acid formation and metabolism.** *Nitric Oxide.* 79 (2018) 38-44.

COLE, M.P.; RUDOLPH, T.K.; KHOO, N.K.; MOTANYA, U.N.; GOLIN-BISELLO, F.; WERTZ, J.W.; SCHOPFER, F.J.; RUDOLPH, V.; WOODCOCK, S.R.; BOLISETTY, S.; ALLI, M.S.; ZHANG, J.; CHEN, Y.E; AGARWAL, A.; FREEMAN, B.A.; BAUER, P.M. - **Nitro-fatty acid inhibition of neointima formation after endoluminal vessel injury.** *Circulation Research.* 105,10 (2009) 965-972.

D'ALESSANDRO, A.; DE PERGOLA, G. - **The Mediterranean Diet: its definition and evaluation of a priori dietary indexes in primary cardiovascular prevention.** *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* 69,6 (2018) 647-659.

D'ISCHIA, M.; NAPOLITANO, A.; MANINI, P.; PANZELLA, L. - **Secondary targets of nitrite-derived reactive nitrogen species: Nitrosation/nitration pathways, antioxidant defense mechanisms and toxicological implications.** *Chemical Research in Toxicology.* 24,12 (2011) 2071-2092.

DAYALAN NAIDU, S.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T. - **Regulation of the mammalian heat shock factor 1.** *FEBS Journal.* 284,11 (2017) 1606-1627.

DE CATERINA, R. - **n-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease.** *New England Journal of Medicine.* 364, 25 (2011) 2439-2450.

DE ZEEUW, D.; AKIZAWA, T.; AUDHYA, P.; BAKRIS, G.L.; CHIN, M.; CHRIST-SCHMIDT, H.; GOLDSBERRY, A.; HOUSER, M.; KRAUTH, M.; HEERSPINK, H.J.L.; MCMURRAY, J.J.; MEYER, C.J.; PARVING, H.H.; REMUZZI, G.; TOTO, R.D.; VAZIRI, N.D.; WANNER, C.; WITTES, J.; WROLSTAD, D.; CHERTOW, G. M. - **Bardoxolone Methyl in Type 2 Diabetes and Stage 4 Chronic Kidney Disease.** *New England Journal of Medicine.* 369, 26 (2013) 2492-2503.

DEEN, A.J.; SIHVOLA, V.; HÄRKÖNEN, J.; PATINEN, T.; ADINOLFI, S.; LEVONEN, A. L. - **Regulation of stress signaling pathways by nitro-fatty acids.** *Nitric Oxide - Biology and Chemistry.* 78 (2018) 170-175.

DELMASTRO-GREENWOOD, M.; HUGHAN, K.S.; VITTURI, D.A.; SALVATORE, S.R.; GRIMES, G.; POTTI, G.; SRUTI, S.; SCHOPFER, F.J.; GLADWIN, M.T.; FREEMAN, B.A;

- WENDELL, S.G. - **Nitrite and nitrate-dependent generation of anti-inflammatory fatty acid nitroalkenes.** *Free Radical Biology and Medicine.* 89 (2015) 333–341.
- DENT, R.; TRUDEAU, M.; PRITCHARD, K. I.; HANNA, W.M.; KAHN, H.K.; SAWKA, C.A.; LICKLEY, L.A.; RAWLINSON, E.; SUN, P.; NAROD, S. A. - **Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence.** *Clinical Cancer Research.* 13,15 (2007) 4429-4434.
- FAZZARI, M.; TROSTCHANSKY, A.; SCHOPFER, F.J.; SALVATORE, S.R.; SÁNCHEZ-CALVO, B.; VITTURI, D.; VALDERRAMA, R.; BARROSO, J.B.; RADİ, R.; FREEMAN, B.; RUBBO, H. - **Olive and olive oil are sources of electrophilic fatty acid nitroalkenes.** *PLoS ONE.* 9,1 (2014).
- FERREIRA, A.M.; FERRARI, M.I.; TROSTCHANSKY, A.; BATTHYANY, C.; SOUZA, J. M.; ALVAREZ, M.N.; LÓPEZ, G.V.; BAKER, P.R.S.; SCHOPFER, F.J.; O'DONNELL, V.; FREEMAN, B.A.; RUBBO, H. - **Macrophage activation induces formation of the anti-inflammatory lipid cholesteryl-nitrooleate.** *Biochemical Journal.* 417,1 (2008) 223-238.
- FERREIRA, A.M.; MINARRIETA, L.; BERVEJILLO, M.L.; RUBBO, H. - **Nitro-fatty acids as novel electrophilic ligands for peroxisome proliferator-activated receptors.** *Free Radical Biology and Medicine.* 53,9 (2012) 1654-1663.
- FREEMAN, B. A., O'DONNELL, V. B., & SCHOPFER, F. J. - **The discovery of nitro-fatty acids as products of metabolic and inflammatory reactions and mediators of adaptive cell signaling.** *Nitric Oxide - Biology and Chemistry.* 77 (2018) 106-111.
- FREEMAN, B.A.; PEKAROVA, M.; RUBBO, H.; TROSTCHANSKY, A. - **Electrophilic nitro-fatty acids: nitric oxide and nitrite-derived metabolic and inflammatory signaling mediators.** *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology.* (2017).
- HUGHAN, K.S.; WENDELL, S.G.; DELMASTRO-GREENWOOD, M.; HELBLING, N.; COREY, C.; BELLAVIA, L.; POTTI, G.; GRIMES, G.; GOODPASTER, B.; KIM-SHAPIRO, D.B.; SHIVA, S.; FREEMAN, B.A.; GLADWIN, M.T. - **Conjugated Linoleic Acid Modulates Clinical Responses to Oral Nitrite and Nitrate.** *Hypertension.* 70,3 (2017) 634-644.
- JANSSON, E. Å., HUANG, L., MALKEY, R., GOVONI, M., NIHLÉN, C., OLSSON, A., STENSDOTTER, M.; PETERSSON, J.; HOLM, L.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. O. - **A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis.** *Nature Chemical Biology.* 4,7 (2008) 411-417.



JOBAGY, S.; TAN, R.J. - **Nitrolipids in kidney physiology and disease.** *Nitric Oxide - Biology and Chemistry.* 78 (2018) 121-126.

KANSANEN, E.; BONACCI, G.; SCHOPFER, F.J.; KUOSMANEN, S.M.; TONG, K.I.; LEINONEN, H.; WOODCOCK, S.R.; YEMAMOTO, M.; CARLBERG, C.; YLA-HERTTUALA, S.; FREEMAN, B.C.; LEVONEN, A. L. - **Electrophilic nitro-fatty acids activate Nrf2 by a Keap1 cysteine 151-independent mechanism.** *Journal of Biological Chemistry.* 286,16 (2011) 14019-14027.

KANSANEN, E.; JYRKKÄNEN, H.-K., VOLGER, O. L., LEINONEN, H., KIVELÄ, A. M., HÄKKINEN, S.-K.; WOODCOCK, S.R.; SCHOPFER, F.J.; HORREVOETS, A.; YLA-HERTTUALA, S.; FREEMAN, B.A.; LEVONEN, A.-L. - **Nrf2-dependent and -independent Responses to Nitro-fatty Acids in Human Endothelial Cells.** *Journal of Biological Chemistry.* 284,48 (2009) 33233-33241.

KHOO, N.K.H.; FAZZARI, M.; CHARTOUMPEKIS, D.V.; LI, L.; GUIMARAE, D.A.; ARTEEL, G.E.; SHIVA, S.; Freeman, B.A. - **Electrophilic nitro-oleic acid reverses obesity-induced hepatic steatosis.** *Redox Biology.* 22 (2019) 101132.

KHOO, N.K.H.; LI, L.; SALVATORE, S.R.; SCHOPFER, F.J.; FREEMAN, B. A. - **Electrophilic fatty acid nitroalkenes regulate Nrf2 and NF-κB signaling:A medicinal chemistry investigation of structure-function relationships.** *Scientific Reports.* 8,1 (2018) 1-16.

KHOO, N.K.H.; RUDOLPH, V.; COLE, M.P.; GOLIN-BISELLO, F.; SCHOPFER, F.J.; WOODCOCK, S.R.; BATTYANY, C.; FREEMAN, B.A. - **Activation of vascular endothelial nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 expression by electrophilic nitro-fatty acids.** *Free Radical Biology and Medicine.* 48,2 (2010) 230-239.

LAWRENCE, T. - **The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 1,6 (2009) 1-10.

LUNDBERG, J.O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M.T. - **The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics.** *Nature Reviews Drug Discovery.* 7,2 (2008) 156-167.

MARQUES, L. – **Cancro da mama.** *Revista Portuguesa de Clínica Geral.* 19,19 (2003) 9-12.

MELO, T.; MARQUES, S.S.; FERREIRA, I.; CRUZ, M.T.; DOMINGUES, P.; SEGUNDO, M.A.; DOMINGUES, M.R.M. - **New Insights into the Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Nitrated Phospholipids.** *Lipids.* 53,1 (2018) 117-131.

MOLLENHAUER, M.; MEHRKENS, D.; RUDOLPH, V. - **Nitrated fatty acids in cardiovascular diseases.** *Nitric Oxide - Biology and Chemistry.* 78 (2018) 146-153.

QIAO, Y.; HE, H.; JONSSON, P.; SINHA, I.; ZHAO, C.; DAHLMAN-WRIGHT, K. - **AP-1 is a key regulator of proinflammatory cytokine TNF $\alpha$ -mediated triple-negative breast cancer progression.** *Journal of Biological Chemistry.* 291, 10 (2016) 5068-5079.

RATZIU, V. - **Pharmacological agents for NASH.** *Nature Reviews-Gastroenterology and Hepatology.* 10,11 (2013) 676-685.

ROCHA, B.S.; GAGO, B.; BARBOSA, R.M.; LUNDBERG, J.O.; MANN, G.E.; RADI, R.; LARANJINHA, J. - **Pepsin is nitrated in the rat stomach, acquiring antiulcerogenic activity: A novel interaction between dietary nitrate and gut proteins.** *Free Radical Biology and Medicine.* 58,2 (2013) 26-34.

ROCHA, B.S.; GAGO, B.; BARBOSA, R.M.; LUNDBERG, J.O.; RADI, R.; LARANJINHA, J. - **Intragastric nitration by dietary nitrite: Implications for modulation of protein and lipid signaling.** *Free Radical Biology and Medicine.* 52,3 (2012) 693-698.

ROM, O.; KHOO, N.K.H.; CHEN, Y.E.; Villacorta, L. - **Inflammatory signaling and metabolic regulation by nitro-fatty acids.** *Nitric Oxide - Biology and Chemistry.* 78 (2018) 140-145.

RUBBO, H. (2013). **Nitro-fatty acids: Novel anti-inflammatory lipid mediators.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 46,9. (2013) 728-734.

SCHOPFER, F.J.; LIN, Y.; BAKER, P.R.S.; CUI, T.; GARCIA-BARRIO, M.; ZHANG, J.; CHEN, K.; CHEN, Y.E; FREEMAN, B. A. - **Nitrolinoleic acid: An endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligand.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 102,7 (2005) 2340-2345.

SCHOPFER, F.J.; BAKER, P.R.S.; GILES, G.; CHUMLEY, P.; BATTHYANY, C.; CRAWFORD, J.; PATER, R.P.; HOGG, N.; BRANCHAUD, B.P.; LANCASTER, J.R.J.; Freeman, B.A. - **Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: Nitrolinoleic acid is a hydrophobically stabilized nitric oxide donor.** *Journal of Biological Chemistry.* 280,19 (2005) 19289-19297.

SCHOPFER, F.J.; VITTURI, D.A.; JORKASKY, D.K.; FREEMAN, B.A. - **Nitro-fatty acids: New drug candidates for chronic inflammatory and fibrotic diseases.** *Nitric Oxide - Biology and Chemistry.* 79 (2018)31-37.

SHEN, W.; MCINTOSH, M.K. - **Nutrient Regulation: Conjugated Linoleic Acid's Inflammatory and Browning Properties in Adipose Tissue.** *Annual Review of Nutrition.* 36,1 (2016). 183-210.

SINGH, R.B.; MENGI, S.A.; XU, Y.J.; ARNEJA, A.S.; DHALLA, N.S. - **Nutrient Regulation: Conjugated Linoleic Acid's Inflammatory and Browning Properties in Adipose Tissue.** *Experimental and Clinical Cardiology.* 36 (2002) 183-210.

SPECTOR, A. A.; KIM, H.-Y. - **Discovery of essential fatty acids.** *Journal of Lipid Research.* 56,1 (2015) 11-21.

SPRAGUE, A.H.; KHALIL, R.A. - **Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease.** *Biochemical Pharmacology.* 78,6 (2009) 539-552.

SUZUKI, T.; MOTOHASHI, H.; YAMAMOTO, M.- **Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway.** *Trends in Pharmacological Sciences.* 34,6 (2013) 340-346.

TROSTCHANSKY, A.; RUBBO, H. - **Nitrated fatty acids: Mechanisms of formation, chemical characterization, and biological properties.** *Free Radical Biology and Medicine.* 44,11 (2008) 1887-1896.

TSIKAS, D.; ZOERNER, A.; MITSCHKE, A.; HOMSI, Y.; GUTZKI, F.M.; JORDAN, J. - **Specific GC-MS/MS stable-isotope dilution methodology for free 9- and 10-nitro-oleic acid in human plasma challenges previous LC-MS/MS reports.** *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.* 877,26 (2009) 2895–2908.

VIHERVAARA, A.; SISTONEN, L. - **HSF1 at a glance.** *Journal of Cell Science.* 127,2 (2014) 261–266.

VILLACORTA, L.; CHANG, L.; SALVATORE, S.R.; ICHIKAWA, T.; ZHANG, J.; PETROVIC-DJERGOVIC, D.; JIA, L.; CARLSEN, H.; SCHOPFER, F.J.; FREEMAN, B.A.; Chen, Y. E. - **Electrophilic nitro-fatty acids inhibit vascular inflammation by disrupting LPS-dependent TLR4 signalling in lipid rafts.** *Cardiovascular Research.* 98,1 (2013) 116–124.

VILLACORTA, L.; ZHANG, J.; GARCIA-BARRIO, M. T.; CHEN, X.; FREEMAN, B.A.; CHEN, Y.E.; CUI, T. - **Nitro-linoleic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via the Keap1/Nrf2 signaling pathway.** *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 293,1 (2007). H770–H776.

VITTURI, D.A.; MINARRIETA, L.; SALVATORE, S.R.; POSTLETHWAIT, E.M.; FAZZARI, M.; FERRER-SUETA, G.; LANCASTER, J.R.; FREEMAN, B.A.; SCHOPFER, F. J. - **Convergence**

**of biological nitration and nitrosation via symmetrical nitrous anhydride.** *Nature Chemical Biology*. 11,7 (2015) 504-510.

WANG, S.; DOUGHERTY, E.J.; DANNER, R.L. - **PPAR $\gamma$  signaling and emerging opportunities for improved therapeutics.** *Pharmacological Research*. 111 (2016) 76–85.

WANG, W.; LI, C.; YANG, T. - **Protection of nitro-fatty acid against kidney diseases.** *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 310,8 (2015) F697–F704.

WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. O. - **Novel Aspects of Dietary Nitrate and Human Health.** *Annual Review of Nutrition*. 33,1 (2013) 129-159.

WOODCOCK, C.C.; HUANG, Y.; WOODCOCK, S.R.; SALVATORE, S.R.; SINGH, B.; GOLIN-BISELLO, F.; DAVIDSON, N.E.; NEUMANN, C.A.; FREEMAN, B.A.; WENDELL, S.G. - **Nitro-fatty acid inhibition of triple-negative breast cancer cell viability, migration, invasion, and tumor growth.** *Journal of Biological Chemistry*. 293,4 (2018) 1120 - 1137.

WOODCOCK, S.R.; BONACCI, G.; GELHAUS, S.L.; SCHOPFER, F.J. - **Nitrated fatty acids: Synthesis and measurement.** *Free Radical Biology and Medicine*. 59 (2013) 14–26.