



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Sara Henrique Silvestre Neves Jacinto

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Processos Biotecnológicos aplicados ao Transplante de Órgãos” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação do Dr. Rui Rodrigues, Dr. Gennady Bulatnikov e do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Julho de 2019



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

**Sara Henrique Silvestre Neves Jacinto**

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Processos Biotecnológicos aplicados ao Transplante de Órgãos” referentes à Unidade “Estágio Curricular”, sob a orientação do Dr. Rui Rodrigues, Dr. Gennady Bulatnikov e do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Julho 2019

Eu, Sara Henrique Silvestre Neves Jacinto, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2013150351, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Processos Biotecnológicos Aplicados ao Transplante de Órgãos” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 8 de julho de 2019.

Sara Henrique Silvestre Neves Jacinto  
(Sara Henrique Silvestre Neves Jacinto)

“All our dreams can come true if we have the courage to pursue them”

**-Walt Disney**

## **Agradecimentos**

**Aos meus Pais**, pois sem vocês, nada disto teria sido possível. Foi graças aos vossos ensinamentos e ao vosso apoio, que sempre lutei e consegui aquilo que queria. Obrigado pelas palavras de conforto nos momentos que mais precisei, pelos beijos e pelos abraços calorosos que sempre recebia quando chegava a casa. Obrigado pelos conselhos, que sempre me guiaram ao longo desta jornada. Obrigado por terem feito de mim a melhor pessoa que podia ser. Estes seis anos foram uma aventura para nós e, com certeza, também vão sentir a Saudade de Coimbra.

**Ao meu Irmão**, pela ligação inseparável que temos. Obrigado por todo o apoio que me deste ao longo destes anos. Fizeste-me sempre sentir segura do mundo e de mim mesma, pois sabia que, apesar da distância física, estarias sempre comigo, quando mais precisava. Obrigado pelas horas no Skype em que passávamos sem dizer nada, só a fazer companhia um ao outro. Irei para sempre guardar estes momentos.

**Aos meus Avós**, que sempre se interessavam pelo meu trabalho, mesmo que não entendessem todos os termos que eu dizia. Obrigado pelo carinho que me demonstraram sempre que estávamos juntos. Esses momentos acalmavam um bocadinho a saudade. E Avó: a tua neta está finalmente a acabar o curso! Acredito que, onde estejas, estás a ver isto e a contar aos anjos todos, cheia de orgulho, que esta é a tua netinha farmacêutica, tal como fazias antes.

**Ao Kevin**, por me teres escolhido. Apareceste na minha vida como um raio de sol quando mais precisava. Obrigado por toda a amizade e amor incondicional que demonstraste ao longo destes anos e que ainda demonstras agora. Obrigado por seres a minha rocha quando mais preciso de apoio e por estares sempre de braços abertos quando mais preciso de conforto. Mal posso esperar pela próxima aventura da nossa vida. *I love you too much!*

**À restante família**, por todo o carinho e apoio que sempre me foram dando ao longo destes anos. Madrinha Inês, obrigado por estares sempre pronta para me ajudar, em qualquer altura, e por me acompanhares nesta cidade que ambas amamos. Não sei o que seria de mim se não te tivesse comigo em Coimbra. Madrinha Lisete e Padrinho Paulo, obrigado por me terem acompanhado nesta jornada. Não teria sido igual sem vocês.

**À Beatriz**, por seres a minha melhor amiga e a melhor irmã (de mães diferentes) que podia ter. Obrigado pelo carinho, pelos conselhos, pelos desenhos e cartas escritas. Obrigado pelas semanas em que decidias deixar a terrinha e ver ter comigo. Nunca esquecerei esses dias e todas as aventuras que tivemos nesta cidade. *You're my person!*

**Aos meus amigos de Coruche**, por termos partilhado todas as nossas experiências académicas ao longo destes anos. Esta jornada foi muito mais divertida com todos vocês. Obrigado pelas noitadas na Rosa a contar todas as aventuras que nos tinham acontecido nos últimos meses.

**À Cristiana**, por seres o meu pedacinho de Ribatejo em Coimbra. Obrigado por teres sido a melhor colega de casa que eu tive a sorte de ter. Obrigado pelas longas conversas depois das aulas, quando chegávamos a casa e nos sentávamos na cama uma da outra. Obrigado pelos jantares, pelas conversas à hora da telenovela, pelos conselhos de moda e por todas as outras coisas que aconteceram nestes 6 anos em que estivemos juntas. Obrigado por seres a melhor amiga que Coimbra me deu.

**Aos meus amigos de Coimbra**, por terem aparecido na minha vida. Nunca pensei que iria encontra pessoas tão espetaculares e que significassem tanto para mim. Obrigado pelos conselhos, pelos jantares, pelas saídas, pelas tonteiras e pelos apontamentos. Este curso não teria sido o mesmo sem vocês. Estes anos não teriam sido os mesmos sem vocês. Vou-vos levar para a vida.

**À Bali**, por me distrair quando mais precisava. Obrigado pelas horas que passavas ao meu colo, enquanto estudava. Obrigado pelas alturas em que achavas que eu já estava a estudar de mais e te colocavas em cima do meu computador e dos meus papeis para receber festas.

**Aos Professores Doutores da Faculdade**, por me incentivarem a descobrir o mundo. Obrigado por tudo aquilo que me ensinaram ao longo destes anos. Obrigado por todos os conselhos e por todas as oportunidades que me proporcionaram. Terei sempre comigo os vossos ensinamentos.

**Ao Professor Doutor Luís Almeida**, por todo o apoio que me deu ao longo destes últimos meses. Obrigado pela sua ajuda e interesse nesta monografia. Os seus comentários e conselhos tornaram isto possível.

**À equipa técnica do Hospital da Luz de Lisboa**, por me terem mostrado o que é ser um Farmacêutico Hospitalar. Obrigado por me terem recebido e obrigado por todos os conhecimentos e ensinamentos que me transmitiram ao longo dos 2 meses de estágio. Obrigado especial ao Dr. Rui Rodrigues, que sempre me acompanhou. Espero um dia estar com vocês, não como estagiária, mas como colega farmacêutica.

**À equipa técnica da Farmácia da Misericórdia**, por me terem recebido de braços abertos. Obrigado por me terem demonstrado o que trabalhar em Farmácia Comunitária e o peso de ser farmacêutico. Obrigado por todos os conhecimentos transmitidos ao longo destes 4 meses de estágio. Obrigado especial ao Dr. Gennady Bulatnikov, por todo o apoio que me deu. Fizeram de mim uma melhor profissional farmacêutica.

**À Nossa Senhora do Castelo e à Nossa Senhora de Fátima**, por me terem acompanhado nesta jornada. Sem o Vosso apoio, esta jornada teria sido muito mais difícil. Obrigado por me protegerem, sempre. Ámen.

**À cidade de Coimbra**, por me ter acolhido. Apaixonei-me por esta cidade ainda do meu percurso académico ter começado, e esse amor só tem aumentado. Obrigado pelo convívio, pelas festas, pelas gentes desta terra, pelas serenatas, pela vida que ganhei. Irei para sempre sentir Saudade.

Por fim, obrigado a todos aqueles que fizeram desta jornada, um dos melhores momentos da minha vida.

## Índice

### Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Hospitalar

Lista de Abreviaturas .....	11
1. Introdução.....	12
2. Contextualização do Hospital da Luz de Lisboa .....	13
3. Resumo do Estágio.....	13
4. Análise SWOT .....	18
4.1. Forças .....	18
4.1.1. Disponibilização de material técnico-científico.....	18
4.1.2. Plano de Estágio .....	19
4.1.3. Acompanhamento permanente pela Equipa Técnica.....	19
4.1.4. Baixo número de estagiários.....	19
4.2. Fraquezas .....	19
4.2.1. Desconhecimento das abreviaturas/siglas usadas no Sistema Informático.....	19
4.2.2. Baixa formação em Farmácia Hospitalar .....	20
4.2.3. Duração do estágio / Estágio observacional .....	20
4.3. Oportunidades.....	20
4.3.1. Observação de uma cirurgia / Acompanhamento pós-operatório .....	20
4.3.2. Ida a reuniões clínicas multidisciplinares .....	21
4.3.3. Realização da validação.....	21
4.4. Ameaças .....	21
4.4.1. Mudança de instalações e pessoal técnico .....	21
4.4.2. Área de difícil acesso .....	21
5. Conclusão .....	22
6. Bibliografia.....	22
7. Anexos.....	23
Anexo I – Plano do Estágio .....	23
Anexo 2 – Anexo IV da Portaria nº 981/98 (Estupefacientes) .....	24
Anexo 3 – Anexo VII da Portaria nº 981/98 (Estupefacientes).....	25
Anexo 4 – Anexo X da Portaria nº 981/98 (Estupefacientes).....	26



## Parte II – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas .....	28
1. Introdução.....	29
2. Análise SWOT.....	30
2.1. Forças .....	30
2.1.1. Ter realizado estágio na Farmácia anteriormente.....	30
2.1.2. Plano de Estágio .....	30
2.1.3. Farmácia direcionada para grupos de risco .....	33
2.1.4. Estagiária Única .....	34
2.2. Fraquezas .....	34
2.2.1. Conhecimentos reduzidos das marcas comerciais .....	34
2.2.2. Dificuldade no aconselhamento em Dermocosmética .....	34
2.3. Oportunidades.....	35
2.3.1. Participação / Realização de diversas Formações.....	35
2.3.2. Preparação de Manipulados.....	35
2.4. Ameaças .....	36
2.4.1. Medicamentos Esgotados e Rateados .....	36
2.4.2. Receitas Manuais.....	36
3. Casos Clínicos.....	37
3.1. Tratamento da Diarreia.....	37
3.2. Tratamento da Rinite Alérgica.....	37
3.3. Tratamento da sintomatologia da Varicela.....	38
4. Conclusão .....	38
5. Bibliografia.....	39
6. Anexos.....	40
Anexo 1 – Circular sobre o Registo de Psicotrópicos e Estupefacientes .....	40
Anexo 2 – Material necessário à preparação de Solução Alcoólica de Ácido Bórico à Saturação.....	41
Anexo 3 – Material necessário à preparação de Vaselina Salicilada .....	41
Anexo 4 – Certificado de Realização de Formação pela <i>Pierre Fabre</i> ® .....	42

## Parte III – Processos Biotecnológicos Aplicados ao Transplante de Órgãos

Resumo .....	44
Abstract .....	45
Lista de Abreviaturas .....	46
1. Introdução.....	47
2. Órgãos transplantados de Dadores .....	48
2.1. Tipos de doação de órgãos .....	48
2.2. Problemas Associados .....	49
2.2.1. Rejeição do Órgão .....	49
2.2.2. Administração de Imunossupressores .....	50
3. Órgãos produzidos em laboratório com recurso à bioengenharia .....	52
3.1. Decelularização-recelularização.....	52
3.2. Bio-impressão 3D .....	54
3.3. Problemas associados .....	56
4. Órgãos produzidos em organismos por recapitulação do desenvolvimento embrionário .....	56
4.1. Órgãos provenientes de animais: xenotransplante .....	56
4.1.1. O Porco como animal dador .....	56
4.1.2. Resposta Imunológica e Rejeição.....	57
4.1.3. Situação atual.....	59
4.2. Órgãos humanos em animais: Quimeras .....	63
4.2.1. Métodos para geração de quimeras .....	64
4.2.2. Situação Atual.....	66
4.2.3. Problemas associados .....	67
5. Resolução da compatibilidade/rejeição dos órgãos: Órgãos Dadores Universais.....	68
6. Problemas Bioéticos .....	70
7. Conclusões .....	72
8. Bibliografia.....	73
9. Anexo.....	79
Anexo I – Tabela comparativa das diferentes técnicas de bio-impressão 3D .....	79

## Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Hospitalar

## **Lista de Abreviaturas**

AO – Auxiliar Operacional

CHUC – Centro Hospitalar Universitário de Coimbra

DIDDU – Distribuição Individual Diária em Dose Unitária

FH – Farmacêutico Hospitalar

HBA – Hospital Beatriz Ângelo

HLL – Hospital da Luz de Lisboa

JCI – *Joint Commission International*

LASA – *look-alike sound-alike*

PDU – Plataforma da Dose Unitária

RCM – Resumo das Características do Medicamento

SF – Serviços Farmacêuticos

SNC – Sistema Nervoso Central

SWOT – *Strengths* (Forças), *Weaknesses* (Fraquezas), *Opportunities* (Oportunidades) e *Threats* (Ameaças)

TEV – Tromboembolismo Venoso

TF – Técnicos de Farmácia

UCCP – Unidade de Cuidados Continuados e Paliativos

UCI – Unidade de Cuidados Intensivo

UEI – Unidade Especial de Internamento

## I. Introdução

O Farmacêutico Hospitalar (FH) é o profissional de saúde especialista do medicamento e, como tal, tem o dever de “colaborar com todos os profissionais de saúde, promovendo a utilização segura, eficaz e racional dos medicamentos, assegurar-se que, na dispensa do medicamento, o doente recebe informação correta sobre a sua utilização, dispensar ao doente o medicamento em cumprimento da prescrição médica ou exercer a escolha que os seus conhecimentos permitem e que melhor satisfação as relações risco/benefício e custo/benefício e assegurar, em todas as situações, a máxima qualidade dos serviços que presta, de harmonia com as boas práticas de farmácia”<sup>1</sup>.

O principal papel do Farmacêutico Hospitalar é otimizar os resultados em saúde através do uso correto, seguro, eficaz e apropriado dos medicamentos, tendo em atenção a relação custo/efetividade destes. No entanto, este profissional apresenta formação nas mais diversas atividades, para além do uso racional do medicamento, tais como: Aprovisionamento e Gestão de *Stocks*, Farmacotecnia, Validação da Medicação, Farmacocinética e Monitorização, Ensaio Clínicos, entre outras.

Foi neste âmbito, de profissional multidisciplinar, que escolhi realizar o estágio em Farmácia Hospitalar. Quando me foi dada essa oportunidade, entendi que seria uma mais valia à minha formação, tanto académica como profissional, visto ser muito difícil termos contato com esta área profissional fora do ambiente académico. Para além disso, este estágio seria uma oportunidade de comparar o ambiente real da prática farmacêutica com a informação teórica, recebida nos 5 anos de faculdade.

O presente relatório descreve o estágio realizado nos Serviços Farmacêuticos (SF) do Hospital da Luz de Lisboa (HLL), que decorreu no período de 7 de janeiro a 1 de março de 2019 sob a orientação do Dr. Rui Rodrigues. Este relatório irá consistir numa análise SWOT, onde serão avaliadas as forças, as fraquezas, as ameaças e as oportunidades com que me deparei ao longo deste estágio.

## 2. Contextualização do Hospital da Luz de Lisboa

O HLL é um hospital privado, localizado na Avenida Lusíada, em Lisboa. Pertence ao Grupo Luz Saúde, que tem por missão “alcançar os melhores resultados de saúde na perspetiva dos doentes através de um diagnóstico e tratamento rápido e eficaz, com absoluto respeito pela sua individualidade e criar uma organização capaz de atrair, desenvolver e reter pessoas excecionais”, assumindo o compromisso de excelência, inovação e talento<sup>2</sup>.

Os SF do HLL estão localizados no piso -I do Hospital, encontram-se abertos de segunda a sexta das 9h-20h e sábado das 15h-19h, havendo sempre um farmacêutico de prevenção 24h disponível para fornecer algum medicamento dos circuitos especiais, e são “responsáveis pela viabilização e disponibilização de todo o arsenal terapêutico – medicamentos e outros produtos farmacêuticos – aos diversos serviços do Hospital”<sup>3</sup>. A equipa técnica é dirigida pela Dra. Andreia Duarte e é constituída por farmacêuticos, técnicos de farmácia, assistentes operacionais e administrativos que contribuem para “garantir a obtenção dos melhores resultados terapêuticos, com a máxima segurança para os doentes”<sup>3</sup>.

Com o objetivo de melhorar a qualidade dos serviços prestados, o HLL adotou “os padrões da *Joint Commission International* (JCI) como referência para a acreditação de qualidade” e em 2018 foi acreditado pelo JCI com o certificado de qualidade<sup>4</sup>. Para além disso, todos os hospitais do Grupo adotaram “o referencial normativo NP EN ISO 9001 (Sistemas de Gestão da Qualidade) e NP EN ISO 14001 (Sistemas de Gestão Ambiental), para a certificação dos seus serviços”<sup>5</sup>.

## 3. Resumo do Estágio

Este estágio foi dividido por partes, para que fosse possível o meu contacto com todas as áreas de ação do FH, dentro do HLL (Anexo I).

Na primeira semana de estágio, foi-me apresentada a estrutura dos SF do HLL, o aprovisionamento dos produtos farmacêuticos e a gestão dos *stocks*. Os SF apresentam diversas zonas específicas: preparação da medicação, para distribuir nos diferentes pisos do hospital; produção de estéreis não citotóxicos; produção de estéreis citotóxicos; produção de não estéreis; dois gabinetes de validação das prescrições médicas; zona de armazenamento de estupefacientes; zona de armazenamento de inflamáveis; zona dos frigoríficos; zona de arquivo de ensaios clínicos e zona de receção de encomendas.

Os estupefacientes, bem como as benzodiazepinas, estão armazenados numa sala, com controlo de entrada específico para farmacêuticos, através de cartões eletrónicos. Para evitar erros na dispensa, os estupefacientes e as benzodiazepinas não estão armazenadas por ordem alfabética para evitar os erros *look-alike sound-alike* (LASA) e para que não seja dada um estupefaciente ou benzodiazepina diferente da pedida. Os produtos inflamáveis estão armazenados numa sala com porta corta-fogo e uma parede falsa, para que, em situação de explosão, esta seja para fora do edifício. Outros produtos, cuja sua vigilância está a cargo do FH, são os gases medicinais. Por motivos de segurança, os gases medicinais são armazenados fora dos SF, num local ao ar livre e sem presença de pós.

Os citotóxicos e imunomoduladores estão armazenados em frigoríficos na sala dos frigoríficos. Como são medicamentos de alto risco, está presente uma fita amarela à volta destes frigoríficos para indicar esse aviso. Para além destas classes de medicamentos, as soluções eletrolíticas concentradas, por exemplo potássio, também são medicamentos de alto risco, uma vez que um erro de cálculo pode levar à morte do paciente.

Para realizar a gestão das compras e do *stock* atual dos SF, foi-me dado a conhecer um conjunto de programas. O primeiro foi o programa *eProcurement*, que está presente no site Luz Link, que permite consultar os medicamentos aceites e presentes no formulário do HLL. De seguida foi apresentado o programa Primavera<sup>®</sup> que é um programa onde é realizada a gestão interna das compras e *stocks* e é onde se realizam as encomendas para os SF. Para verificar os *stocks* atuais é necessário aceder ao programa Ulisses que indica o *stock* de medicamentos existentes na máquina *Megamat*<sup>®</sup>, que é um armazém rotativo vertical.

Para realizar uma compra são necessários 3 dados: as entradas e saídas dos medicamentos, que se apresentam pelos consumos mensais e trimestrais, as encomendas pendentes, que são encomendas realizadas no dia anterior ou semana anterior e cuja entrada ainda não foi realizada, e a análise ABC, que são introduzidos numa folha de *Excel*<sup>®</sup>. A análise ABC separa todos os medicamentos presentes nos SF pelas suas quantidades e custo. Por exemplo, os medicamentos de classe A correspondem a 80% dos custos e a 20% dos produtos. Este *template* de *Excel*<sup>®</sup> indica todas as faltas, ou seja, produtos abaixo do ponto de encomenda, e é realizado todos os dias pelas administrativas e confirmado pelo FH.

De seguida passei para a parte da Farmacotécnica, que englobava a Preparação de Citotóxicos, a Preparação de Nutrição Parentérica e outras preparações estéreis não citotóxicas, a Preparação de Medicamentos Manipulados não estéreis e a Reembalagem de Medicamentos.

O laboratório para Produção de Citotóxicos está dividido em 4 zonas: zona de receção de prescrições e saída dos citotóxicos (zona suja), zona de vestuário (zona semi-suja), antecâmara e zona de produção dos citotóxicos, onde está incluída uma câmara de fluxo laminar vertical e a pressão é negativa. Durante o estágio foi possível observar o FH a validar as prescrições dos citotóxicos e os Técnicos de Farmácia (TF) a produzir os citotóxicos. O circuito começava com a receção das prescrições dos citotóxicos, que eram validadas pelo FH. As prescrições eram emitidas pelo médico especialista no programa *Oncofarm*<sup>®</sup> e recolhidas pelo FH no dia anterior à produção dos citotóxicos. Para realizar a validação era necessário confirmar os dados do doente, a terapêutica, considerando o diagnóstico, as doses, tendo em conta o peso ou superfície corporal do doente, e o material necessário para a produção, tendo em conta os volumes necessários. Para além disto, também se confirmava as análises do doente, presentes no *Soarian*<sup>®</sup>, para verificar se era possível realizar o tratamento. Depois da confirmação, era preparado o tabuleiro para a produção da medicação, que era passado para a zona de produção através de um *transfer*. Antes de se entrar no laboratório, era necessário equipar-nos corretamente para garantir a esterilidade presente no interior da zona de produção. Para tal, era necessário colocar proteção para os sapatos, fazer uma correta lavagem das mãos, colocar a toca e máscara, vestir o fato de proteção e calçar as luvas. Dentro da zona de produção, as bancadas são limpas com álcool 70% e é colocado todo o material necessário para a preparação dos citotóxicos, inclusive o material para o caso de extravasão. Entram sempre 2 pessoas para a zona de produção para a realização de dupla validação, tanto no material utilizado, como nos volumes medidos. Quando o citotóxico fica preparado, este é colocado dentro do tabuleiro e é recolocado no *transfer*. O FH recolhe o tabuleiro, e é sua função confirmar a conformidade da preparação e garantir o controlo de qualidade e segurança, conferindo os rótulos e colocando os adesivos indicativos de que este é um medicamento “TÓXICO”, que deve ser colocado no “FRIGORÍFICO”.

No laboratório de Preparação de Estéreis não citotóxicos, tive a oportunidade de observar a preparação das bolsas para Nutrição Parentérica e de outras preparações extemporâneas estéreis como antibióticos e colírios. Apesar da Preparação ser realizada por TF, é o FH que prepara o tabuleiro com todo o material necessário para a preparação dos estéreis, verificando os volumes necessários e os rótulos dos materiais. Os tabuleiros também passam para a zona de produção através de um *transfer*, e também é necessário equipar-nos com bata, touca e luvas, mas estas já são mais simples, logo com um nível de segurança mais baixo. Quando as bolsas de Nutrição Parentérica e outras preparações são terminadas, o FH realiza o controlo de qualidade e confirma os rótulos, para depois libertar o lote.



Para além das Preparações Estéreis e Não Estéreis, está incluída na parte da Farmacotecnia, a reembalagem de medicamentos que é muitas vezes necessária para a dispensa de medicamentos em Distribuição Individual Diária em Dose Unitária (DIDDU). No HLL, a reembalagem é realizada por Auxiliar Operativo (AO) mas o processo é duplamente verificado por um TF e pelo FH. Neste processo apenas eram reembalados os medicamentos cujos alvéolos não apresentassem os dados específicos desse medicamento como lote, data de validade, princípio ativo e dosagem. Por vezes também se realizava reembalagem de fracionamento, onde se podia partir, em duas ou quatro partes, os comprimidos, possibilitando novas dosagens mais baixas.

Após a passagem pela Farmacotecnia, tive a oportunidade de observar como funciona o regime de ambulatório do Hospital Beatriz Ângelo (HBA), um hospital público-privado do Grupo Luz Saúde. No ambulatório, tive a chance de observar a dispensa de medicamentos de venda exclusiva em hospital. Estes medicamentos apresentam curtos intervalos terapêuticos e é necessário um acompanhamento frequente. No HBA, os farmacêuticos estão divididos por serviços para dar apoio aos médicos e para realizar consulta farmacêutica e primeira consulta de tratamento. Foi também possível verificar os protocolos de tratamento para a Esclerose Múltipla, para Terapêutica Anti-Retroviral e da Hepatite, e Hormonoterapia.

No segundo mês do Estágio, fui introduzida ao processo de validação farmacêutica, realizada pelo FH. Neste processo, o FH tem um papel extremamente importante tanto no acompanhamento farmacoterapêutico do paciente como no apoio e auxílio ao médico prescritor. Quando um paciente é internado no HLL, todos os seus dados médicos ficam presentes no programa *Soarian*<sup>®</sup>, tal como as prescrições realizadas pelo médico. Estas prescrições aparecem também na plataforma da dose unitária (PDU), acessível apenas ao FH. Para a realização de uma correta validação farmacêutica, o FH deve recolher toda a informação médica do paciente presente no *Soarian*<sup>®</sup>, compará-la à prescrição realizada e conferir com a bibliografia disponível, tais como os Resumos das Características dos Medicamentos (RCM) e o *UpToDate*<sup>®</sup>. Quando o FH não concorda com a prescrição realizada, ele efetua uma intervenção farmacêutica por via *Soarian*<sup>®</sup>, telefónica ou pessoal, ficando depois ao cargo do médico a alteração, ou não, da prescrição. Só após a realização deste processo é que a medicação é transferida para a DIDDU, onde é separada pelos diferentes pacientes e preparada para ser enviada para os vários pisos. No entanto existem certos produtos medicamentosos, que mesmo validados na prescrição, não entram na DIDDU tais como os medicamentos dos circuitos especiais (psicotrónicos, hemoderivados) e soluções ou suspensões orais de elevado volume. Durante o estágio, tive a oportunidade de observar a

validação farmacêutica, realizada por um FH, nas diferentes unidades de internamento: Pediatria, Cuidados Continuados e Paliativos (UCCP), Ginecologia e Obstetrícia, Medicina Cirúrgica, Unidade de Cuidados Intensivos (UCI) e Unidade Especial e Internamento (UEI).

Durante este período, tive também a oportunidade de observar os circuitos especiais de certos medicamentos: os psicotrópicos, os hemoderivados e os gases medicinais. Os fármacos que têm a designação de “PSICOTRÓPICOS” produzem efeitos nocivos no Sistema Nervoso Central (SNC), induzindo alterações significativas a nível motor e mental, levando a delírio, alucinações, euforia e dependência. Os psicotrópicos estão legislados pelo Decreto-Lei nº 15/93 e pela Portaria nº 981/98, que apresenta diversos anexos obrigatórios responsáveis pelas entradas e saídas de *stock* (Anexo IV), pedidos realizados aos laboratórios (Anexo VII) e pedidos realizados pelos serviços hospitalares à farmácia (Anexo X). A dispensa de psicotrópicos é realizada todos os dias, após a receção de Anexos X dos diversos serviços hospitalares. Os sacos de dispensa são identificados com o piso para que vão e uma etiqueta azul com “PSICOTRÓPICOS” escrito. Os hemoderivados também estão legislados pelo Decreto-Lei nº 1051/2000, onde inclui o modelo 1804, necessário para realizar as requisições deste tipo de medicamentos. As requisições são constituídas por 2 vias (via da farmácia e via do serviço) e só pode ser colocado 1 hemoderivado e 1 paciente por requisição. Cabe ao FH ter em atenção o correto preenchimento destas requisições, realizar a cedência da medicação e verificar e controlar o *stock* deste tipo de medicação.

Por fim, tive também a oportunidade de aprender como funcionam os Ensaio Clínicos nos SF do HLL. O FH é responsável pela receção, armazenamento, preparação, dispensa, recolha e devolução/destruição dos medicamentos experimentais utilizados nos Ensaio Clínicos. O FH é também responsável pelo preenchimento de toda a documentação presente no dossiê do investigador tal como lotes dispensados, quantidades recebidas, validades, etc. Durante o estágio, pude observar todos estes momentos e realizei um curso *online* sobre as boas práticas nos Ensaio Clínicos.

#### 4. Análise SWOT

A análise SWOT é uma ferramenta que permite fazer um diagnóstico estratégico de uma empresa, mas que pode ser utilizado a nível pessoal. Neste caso será utilizada para análise o meu estágio curricular. Esta análise é dividida em dois momentos: a análise interna, onde são determinadas e analisadas as forças e fraquezas com que me deparei ao longo do estágio, e a análise externa, que determina as oportunidades e ameaças que este estágio proporcionou.

**Tabela 1:** Análise SWOT referente ao Estágio Curricular em Farmácia Hospitalar

	<b>FORÇAS</b>	<b>FRAQUEZAS</b>
<b>Análise Interna</b>	Disponibilização de material técnico-científico	Desconhecimento das abreviaturas/siglas usadas no Sistema Informático
	Plano de estágio	Baixa formação em Farmácia Hospitalar
	Acompanhamento permanente pela Equipa Técnica	Duração do estágio / Estágio observacional
	Baixo número de estagiários	
	<b>OPORTUNIDADES</b>	<b>AMEAÇAS</b>
<b>Análise Externa</b>	Observar uma cirurgia / Acompanhamento pós-operatório	Mudança de instalações e pessoal técnico
	Ida a reuniões clínicas multidisciplinares	Área de difícil acesso
	Realização da validação	

##### 4.1. Forças

###### 4.1.1. *Disponibilização de material técnico-científico*

Ao longo do período de estágio foi-me fornecido o acesso a diversos protocolos, artigos, trabalhos e estudos, alguns estrangeiros, mas outros realizados pelo grupo de FH do HLL. Isto permitiu-me ter um maior entendimento e conhecimento de certos procedimentos realizados no hospital, como por exemplo, Protocolos de atuação em caso de extravasão de citotóxicos, Protocolos de terapêutica nutricional parentérica, Protocolos de terapêutica para tratamento de tumores, Protocolos para o tratamento e prevenção do Tromboembolismo Venoso (TEV), entre outros

Também tive a oportunidade de aceder a diversas fontes de informação farmacológica e clínica como o *UpToDate*<sup>®</sup> e o *Paliative Care Formulary*, o que me permitiu aumentar a minha

formação científica e melhor entender certas prescrições nos grupos de risco como crianças, idosos e grávidas.

#### *4.1.2. Plano de Estágio*

A divisão do estágio por etapas, ou serviços, foi fundamental para a minha integração e aprendizagem nas diversas áreas de ação de um FH. Isto permitiu-me acompanhar as diversas áreas com maior atenção, de forma a compreender melhor a função do FH.

#### *4.1.3. Acompanhamento permanente pela Equipa Técnica*

A equipa dos SF do HLL demonstrou-se, desde o início, extremamente atenciosa e preocupada com os estagiários. Estavam sempre disponíveis para nos responder às nossas dúvidas e questões e estimulavam a nossa curiosidade, pedindo para pesquisarmos certos tópicos relevantes no dia-a-dia daquele serviço. Tinham também o cuidado de explicar cada passo das suas tarefas diárias, bem como qualquer particularidade exclusiva aos SF ou à função do FH. Para além disso, toda a equipa dos SF (FH, TF, AO) é muito unida e profissional. Cada profissional de saúde é uma peça importante e a sua função é essencial e necessária. Nesta equipa também se valoriza a contínua procura por mais conhecimento, através da participação em formações e conferências na área da saúde, e incentivando os FH a obterem o grau de especialista em Farmácia Hospitalar pela Ordem dos Farmacêuticos.

Este empenho, dedicação e apoio constantes auxiliaram a minha integração na equipa e facilitaram a minha aprendizagem ao longo do estágio. Para além disso, transmitiram-me valores pessoais e profissionais que tentarei demonstrar na minha vida profissional.

#### *4.1.4. Baixo número de estagiários*

Ao longo dos meus 2 meses de estágio o HLL acolheu apenas duas estagiárias, o que nos permitiu ter um acompanhamento mais individualizado e personalizado. Durante algumas semanas fomos separadas para acompanharmos cada FH individualmente, o que permitiu a criação de uma ligação mais pessoal com a equipa técnica, bem como uma aprendizagem mais personalizada, onde existia espaço e tempo para discussão e troca de informações.

## 4.2. Fraquezas

### *4.2.1. Desconhecimento das abreviaturas/siglas usadas no Sistema Informático*

Durante o processo de validação, era comum utilizar o Soarian® para comparar o historial clínico do paciente com a medicação prescrita para o mesmo. Este programa é principalmente utilizado por médicos e enfermeiros que, devido às suas funções no HLL, têm pouco tempo para descrever todo o historial clínico, e como tal, utilizam abreviaturas e siglas próprias para descreverem mais rapidamente a situação.

No entanto, no percurso académico, não utilizamos muitas abreviaturas e/ou siglas para indicar uma doença ou problema de saúde. Como tal, durante o processo de validação, senti alguma dificuldade a entender o historial clínico dos pacientes. Perdia bastante tempo a procurar o significado das abreviaturas/siglas para conseguir relacionar a razão do internamento com a medicação prescrita.

#### 4.2.2. *Baixa formação em Farmácia Hospitalar*

Neste ano letivo, a regência da cadeira de Farmácia Hospitalar mudou, passando a ser o Prof. Dr. José Feio, Diretor Técnico dos SF do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra (CHUC). Apesar da sua formação ter sido preciosa no entendimento da função, mas logística e de gestão do FH nos SF, faltou alguma formação e apoio na função mais clínica do FH. Considerando que grande parte da função do FH está mais virada para a área clínica, de apoio ao médico e auxílio ao tratamento do paciente, esta vertente ficou a faltar na minha formação académica. Resultante disso, senti-me um pouco perdida e mal preparada durante certos momentos do estágio curricular.

#### 4.2.3. *Duração do estágio / Estágio observacional*

Apesar do estágio estar bem estruturado e a equipa técnica ter-me apoiado em todos os momentos, a duração do estágio é extremamente curta. Para além de se ter de aprender as diferentes características e funções do FH em tempo contado, quando se começa a compreender as funções e a ser capaz de as realizar, o estágio acaba, sem ser possível aprofundar esses conhecimentos e práticas.

### 4.3. Oportunidades

#### 4.3.1. *Observação de uma cirurgia / Acompanhamento pós-operatório*

Durante o tempo do estágio, tive a oportunidade de assistir a uma cirurgia, realizada no bloco operatório do HLL, onde foi realizado um *bypass* num paciente. Nessa cirurgia estive acompanhada por uma médica anestesista que me explicou os diferentes anestésicos utilizados e como manter a anestesia durante toda a cirurgia. Pude também conhecer os diferentes fármacos e dispositivos médicos presentes nos carros cirúrgicos.

Após a cirurgia, o paciente foi internado na UEI para recuperação pós-operatório. Nessa altura, estava a observar o FH responsável pela validação das prescrições provenientes desse serviço. Como tal, pude acompanhar a recuperação do paciente, inclusive visitá-lo no serviço, bem como auxiliar o FH com os pormenores da cirurgia que não vinham explícitos no historial clínico no *Soarian*<sup>®</sup>. Isto possibilitou-me acompanhar todo o processo clínico do paciente e senti-me mais em contato com este.

#### 4.3.2. *Ida a reuniões clínicas multidisciplinares*

Durante o estágio, tive a oportunidade de acompanhar o FH nas reuniões clínicas multidisciplinares dos serviços das UCCP, UCI e UEI. Estas reuniões permitiram-me conhecer os doentes, os seus históricos e situações de internamento antes de observar a validação das prescrições. Com estas reuniões também entendi melhor a importância que o FH tem nestas equipas multidisciplinares, para além de aumentar o seu contato e interação com o paciente.

#### 4.3.3. *Realização da validação*

Para além de observar a validação das prescrições, também tive a oportunidade de realizar algumas por mim própria. O FH permitia-me acesso à plataforma da dose unitária, recolhia informação relativa a cada paciente e às características da sua medicação e discutia as minhas conclusões com o FH responsável. Isto permitiu pôr em prática os meus conhecimentos em Farmacologia e Farmácia Clínica, bem como entender certos protocolos de prescrições específicos para certos tipos de pacientes, como os pacientes cirúrgicos ou pós-parto.

### 4.4. Ameaças

#### 4.4.1. *Mudança de instalações e pessoal técnico*

Quando comecei o estágio no HLL, este encontrava-se em obras, para aumentar o tamanho do Hospital. Com a expansão do HLL, a farmácia irá mudar de instalações e como tal, foi necessário efetuar algumas mudanças no SF do HLL. Isto fez com que a equipa técnica tivesse de dispensar algum do seu tempo nessas mudanças, o que me deixou um pouco à deriva, por certos momentos, mas também tentei sempre ajudar quando precisavam.

Para além disso, houve também mudança do pessoal técnico na primeira semana de estágio, o que fez com que a equipa técnica estivesse mais ocupada a efetuar as alterações necessárias consequentes dessa mudança. Como consequência, não me puderam acompanhar tanto, o que me fez sentir um pouco perdida nessa primeira semana.

#### 4.4.2. *Área de difícil acesso*

Apesar da função fulcral do FH nos hospitais, é cada vez mais notório que estes não são contratados em quantidades suficientes para garantir um bom acompanhamento clínico dos pacientes, bem como o bom funcionamento dos SF hospitalares. Isto ocorre, provavelmente, devido a cortes orçamentais ou más gestões hospitalares, que pode levar, em situações extremas, a encerramentos de SF, noticiados no início deste ano.

## 5. Conclusão

Com este estágio, pude concluir que o FH tem uma função muito mais clínica do que antecipava e muito mais envolvente no processo clínico do paciente. No entanto, o seu contato com este é muito reduzido, havendo, portanto, espaço para melhorar e aumentar este contato.

Este estágio foi uma oportunidade para consolidar e aprofundar os meus conhecimentos teóricos e clínicos, adquiridos durante o percurso académico. Para além disso, pude conhecer todas as funções do FH dentro de um hospital, o que aumentou a minha perceção do trabalho do FH, bem como o meu interesse na área.

Apesar da curta duração do estágio, posso concluir que a minha aprendizagem foi essencial para melhorar as minhas capacidades pessoais e, como dito anteriormente, fortaleceu o meu gosto pela área hospitalar e o meu interesse por seguir esta área, a nível profissional.

## 6. Bibliografia

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos**. Lisboa. (1998) [Acedido a 23 de março de 2019] <https://www.ceic.pt/documents/20727/38736/C%ff%ffdig%2bDeontol%ff%ffgic%2bda%2bOrdem%2bdos%2bFarmac%ff%ffuticos/0e2861ff-ab1f-4368-b6b8-ed097ba4eda3>
2. LUZ SAUDE – **Institucional - Visão, Missão e Valores**. (2019) [Acedido a 23 de março de 2019] <https://www.luzsaude.pt/pt/luz-saude/visao-missao-e-valores/>
3. HOSPITAL DA LUZ – **Serviços Farmacêuticos** (2019) [Acedido a 23 de março de 2019] <https://www.hospitaldaluz.pt/lisboa/pt/o-hospital/servicos-farmaceuticos/>
4. HOSPITAL DA LUZ – **Acreditação de Qualidade** (2019) [Acedido a 23 de março de 2019] <https://www.hospitaldaluz.pt/lisboa/pt/o-hospital/acreditacao-de-qualidade/>
5. HOSPITAL DA LUZ – **Certificações** (2019) [Acedido a 23 de março de 2019] <https://www.hospitaldaluz.pt/lisboa/pt/o-hospital/certificacoes/>

## 7. Anexos

### Anexo I – Plano do Estágio

<b>Período</b>	<b>Área</b>
7/Jan – 8/Jan	Acolhimento no Hospital
8/Jan – 11/Jan	Aprovisionamento e Gestão de Stocks
14/Jan – 22/Jan	Farmacotecnia
23/Jan – 25/Jan	Ambulatório (HBA)
28/Jan – 30/Jan	Pediatria
31/Jan – 1/Fev	Estupefacientes e Psicotrópicos
4/Fev – 8/Fev	Cuidados Continuados e Paliativos
11/Fev – 13/Fev	Ginecologia e Obstetrícia
14/Fev – 15/Fev	Medicina Cirúrgica e Hemoderivados
18/Fev – 22/Fev	UCI e Ensaio Clínicos
25/Fev – 1/Mar	UEI e Apresentação do Trabalho





## ANEXO VII

REQUISIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E SUAS PREPARAÇÕES  
 COMPREENDIDAS NAS TABELAS I, II, III E IV, COM EXCEÇÃO DA II-A,  
 ANEXAS AO DECRETO-LEI N.º 15/93, DE 22 DE JANEIRO, COM  
 RECTIFICAÇÃO DE 20 DE FEVEREIRO

N.º \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
 Nota de encomenda N.º \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

(Nos termos do art.º 18.º do Decreto Regulamentar n.º 61/94, de 12 de outubro)

Requisita-se a \_\_\_\_\_

SUBSTÂNCIAS ACTIVAS E SUAS PREPARAÇÕES				QUANTIDADE	
N.º de Código	Designação	Forma Farmac.	Dosagem	Pedida	Fornecida
Carimbo da entidade requisitante			D.T. ou Farmac. Responsável _____		
			N.º de insc na O. F.    _/_/_/_/_/		
			Data    _/_/_/		
			Ass. legível _____		
Carimbo da entidade fornecedora			Director Técnico _____		
			N.º de insc na O. F.    _/_/_/_/_/		
			Data    _/_/_/		
			Ass. legível _____		

Anexo 4 – Anexo X da Portaria nº 981/98 (Estupefacientes)

## ANEXO X<sup>5</sup>

REQUISIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS SUAS PREPARAÇÕES COMPREENDIDAS NAS TABELAS I, II, III E IV, COM EXCEÇÃO DA II-A,  
ANEXAS AO DECRETO-LEI N.º 15/93, DE 22 DE JANEIRO, COM RECTIFICAÇÃO DE 20 DE FEVEREIRO

N.º

Serviços Farmacêuticos  
do

Código  
SERVIÇO   
SALA

Medicamento (D.C.I.)	Forma Farmacêutica	Dosagem	Código
----------------------	--------------------	---------	--------

Nome do Doente	Cama/ Processo	Quantidade Pedida Ou Prescrita	Enfermeiro que administra o Medicamento		Quantidade Fornecida	Observações
			Rubrica	Data		
Total					Total	

Assinatura legível do director de serviço ou legal substituo  Data ___/___/___ N.º Mec. _____	Assinatura legível do director do serviço farmacêutico ou legal substituo.  Data ___/___/___ N.º Mec. _____	Entregue por (ass. Legível) _____ N.º Mec. _____ Data ___/___/___ Recebido por (ass. Legível) _____ N.º Mec. _____ Data ___/___/___
--	--	--

## Parte II – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

## **Lista de Abreviaturas**

ANF – Associação Nacional de Farmácias

CCF – Centro de Conferência de Faturas

CFP – Cartão das Farmácias Portuguesas

DT – Diretor Técnico

FMC – Farmácia da Misericórdia de Coruche

MNSRM-EF – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica de venda Exclusiva em Farmácia

NC – Nota de Crédito

PCHC – Produtos de *Consumer Health Care*

PVF – Preço de Venda à Farmácia

PVP – Preço de Venda ao Público

SCMC – Santa Casa da Misericórdia de Coruche

SWOT – *Strengths* (Forças), *Weaknesses* (Fraquezas), *Opportunities* (Oportunidades) e *Threats* (Ameaças)

TF – Técnico de Farmácia

## **I. Introdução**

Atualmente, a Farmácia Comunitária é o primeiro local de escolha, por parte dos utentes, para o esclarecimento de dúvidas relacionadas com a sua saúde. Estes dirigem-se à farmácia para, primeiramente, ouvirem o conselho do farmacêutico, antes de se dirigirem ao médico. Tendo em conta este facto, cabe ao farmacêutico ser capaz de dirigir o utente ao médico quando este apresenta sinais e sintomas precoces de doenças ou é identificado, pelo farmacêutico, como um doente de risco, ou, por outro lado, o farmacêutico, como especialista do medicamento, aconselha o correto uso de medicamentos não sujeitos a receita médica e medicamentos de venda exclusiva em farmácia, em situações mais simples, evitando assim o deslocamento desnecessário do utente a outros serviços de saúde<sup>1,2</sup>.

O Farmacêutico Comunitário apresenta assim um papel centrado no utente através da advertência para interações medicamentosas, contraindicações e reações adversas; gestão da terapêutica, garantido o uso racional do medicamento, bem como a sua qualidade, segurança e eficácia; monitorização dos parâmetros bioquímicos e promoção de estilos de vida saudáveis.

Foi nestas bases que realizei o Estágio Curricular em Farmácia Comunitária na Farmácia da Misericórdia de Coruche (FMC), integrada na Santa Casa da Misericórdia de Coruche (SCMC), durante o período de 4 de março a 28 de junho e sob a orientação do Dr. Gennady Bulatnikov. Este relatório irá consistir numa análise SWOT, onde serão avaliadas as forças, as fraquezas, as ameaças e as oportunidades com que me deparei ao longo deste estágio.

## 2. Análise SWOT

A análise SWOT é uma ferramenta que permite fazer um diagnóstico estratégico de uma empresa, mas que pode ser utilizado a nível pessoal. Neste caso será utilizada para análise o meu estágio curricular. Esta análise é dividida em dois momentos: a análise interna, onde são determinadas e analisadas as forças e fraquezas com que me deparei ao longo do estágio, e a análise externa, que determina as oportunidades e ameaças que este estágio proporcionou.

**Tabela 2:** Análise SWOT referente ao Estágio Curricular em Farmácia Comunitária

	<b>FORÇAS</b>	<b>FRAQUEZAS</b>
<b>Análise Interna</b>	Ter realizado estágio na Farmácia anteriormente	Conhecimento reduzido das marcas comerciais
	Plano de estágio	
	Farmácia direcionada para os grupos de risco	Dificuldade no aconselhamento em Dermocosmética
<b>Análise Externa</b>	Estagiária única	
	<b>OPORTUNIDADES</b>	<b>AMEAÇAS</b>
	Participação / Realização de diversas Formações	Medicamentos esgotados e rateados
	Preparação de Manipulados	Receitas manuais

### 2.1. Forças

#### 2.1.1. *Ter realizado estágio na Farmácia anteriormente*

Em 2017, realizei um estágio extracurricular de 1 mês na FMC onde conheci o *layout* da farmácia, a disposição e armazenamento dos medicamentos, e o trabalho de *back office* da farmácia.

Assim, quando iniciei este estágio curricular, já não necessitei de tanto tempo para me ambientar ao espaço, podendo começar logo a trabalhar no primeiro mês, principalmente na parte do armazenamento dos medicamentos e realização das tarefas de *back office*, referidas de seguida.

#### 2.1.2. *Plano de Estágio*

A realização do plano de estágio é necessário para que o estagiário consiga exercer todas as funções desenvolvidas pelo Farmacêutico, numa farmácia comunitária. No início do estágio, o DT pediu-me que fizesse uma tabela, onde fui assinalando quais as tarefas realizadas

e não realizadas, e aquelas em que ainda demonstrava dificuldade. Isto permitiu-me realizar todas as tarefas e melhorá-las ao longo do tempo de estágio.

Receção de encomendas e Armazenamento: No início do estágio, fiquei encarregue de realizar as receções das encomendas na farmácia. As principais encomendas recebidas eram as Diárias, os pedidos diretos aos armazéns, as encomendas das indústrias e as campanhas dos armazéns no fim do mês. Quando a encomenda é recebida na farmácia, é necessário verificar os medicamentos e/ou produtos de *Consumer Health Care* (PCHC) recebidos com aquelas faturados, bem como comparar a fatura com a nota de encomenda, para verificar se vieram, para a farmácia, os produtos pedidos. De seguida, é dada entrada da encomenda, no sistema SIFARMA2000®, e são verificados os *stocks* existentes, bem como a validade descrita pelo sistema. Se os medicamentos/PCHC, presentes na encomenda, tiverem uma validade superior à indicada no sistema, e existir *stock* na farmácia, a validade não é alterada; mas se a validade for inferior, esta tem de ser alterada no sistema. Por fim, são verificados os Preço de Venda à Farmácia (PVF) e Preço de Venda ao Público (PVP), bem como os descontos feitos à farmácia e a margem de lucro de cada PCHC. Após ser dada entrada das encomendas, estas devem ser arrumadas, tendo sempre em atenção a regra “*first in, first out*”, de forma a que os medicamentos e PCHC com menor validade possam ser vendidos primeiros.

Realizei a receção de encomendas e o armazenamento de medicamentos e PCHC ao longo do período de estágio.

Gestão de *stocks*: Quando está a ser dada entrada das encomendas, ou por vezes durante um atendimento, verifica-se a presença de um erro de *stock*. Na maioria das vezes, o *stock* real é inferior ao *stock* descrito pelo SIFARMA2000®. Nestas alturas, é informado o DT, que verifica o *stock* existente para encontrar o erro. Para além disto, também é necessário controlar os prazos de validade. Todos os meses é retirada uma listagem de todos os medicamentos e PCHC cuja validade termina no período de 3 meses. Se o prazo de validade está conforme o indicado na lista, esses produtos são colocados à parte dos restantes e, caso não sejam vendidos em tempo útil, são devolvidos. Se os produtos apresentam outra validade, esta é alterada no sistema SIFARMA2000®. Apesar de não ter realizado nenhuma devolução de produtos com curto prazo, criei diversas listas para verificar os *stocks* existentes, bem como verificar a sua validade.

Existe também certos *stocks* que são verificados exclusivamente pelo Farmacêutico responsável: os psicotrópicos e os produtos de protocolo, como as lancetas de medição da glicémia e as agulhas da insulina. Estes *stocks* são verificados uma vez por mês, normalmente



ao dia 1 de cada mês, tal como o envio das listagens dos psicotrópicos e benzodiazepinas (ver Anexo I).

Devoluções e Notas de Crédito: Ao longo do estágio realizei diversas devoluções de medicamentos e PCHC por erro de pedido. Os principais armazenistas com que trabalhávamos eram a *Empifarma*, *OCP* e *Cooprofar*, que enviavam as respetivas Notas de Crédito (NC) dessas devoluções. Quando as NC eram recebidas, eu regularizava as devoluções correspondentes, colocando o PVF e IVA, indicado na NC, no SIFARMA2000®.

Atendimento ao público: No início do estágio estive a acompanhar os farmacêuticos e os TF a realizarem o atendimento ao público. Com eles, aprendi diversas técnicas de comunicação e aconselhamento, bem como a postura e atitude que um farmacêutico tem de ter, para realizar um atendimento com qualidade. Mais tarde comecei a realizar o atendimento por mim própria, sob vigilância do DT ou do Farmacêutico Adjunto, tendo em atenção a forma como comunicava com o utente, explicando a medicação de forma clara e entendível, e confirmando sempre com a equipa técnica, qualquer aconselhamento que realizava durante o atendimento. Para além disso, também realizei diversas regularizações das contas de certos utentes, que tinham autorização de crédito na farmácia.

Certos utentes têm, associado à sua ficha na farmácia, o Cartão das Farmácias Portuguesas (CFP). Quando é feita uma venda a um utente com CFP, é automaticamente introduzido, no cartão, um número de pontos, que podem depois ser rebatidos em produtos ou em vales de descontos numa próxima compra. Ao longo do estágio fiz diversos rebates de pontos, quer em produtos, como gel de banho ou cremes, quer em vales de desconto, sendo o mais comum, um desconto de 2€ na compra correspondente a 50 pontos no cartão.

Conferência, fecho e faturação do receituário: Os medicamentos adquiridos através de receita médica, podem ser comparticipados apenas pelo Serviço Nacional de Saúde, ou em conjunto com outra entidade de saúde privada ou subsistema. Algumas entidades de saúde privadas, como a Fidelidade, Seguradoras Unidas e SAMS, comparticipam a maior percentagem dos medicamentos adquiridos, podem chegar a comparticipações de 100%.

O fecho do receituário é realizado ao fim de cada mês, onde cada regime de comparticipação é separado em lotes organizados de 30 receitas. Cada receita manual é previamente verificada, por vezes por dois farmacêuticos, tendo em atenção o prazo de validade, a presença da assinatura e vinheta do médico prescriptor, a confirmação que o organismo de comparticipação faturado corresponde ao que está indicado, a presença da

assinatura do utente, o carimbo da farmácia, a assinatura do profissional que dispensou, a data da dispensa, entre outros.

Os lotes das receitas compartilhadas pelo SNS são recolhidos pelos Correios e enviados para o Centro de Conferência de Faturas (CCF) do SNS. Para o CCF são enviados os lotes de receitas, o verbete de identificação do lote carimbado, três cópias do resumo de todos os lotes carimbado e três cópias da fatura mensal à entidade. A quarta cópia do resumo dos lotes e da fatura mensal é enviada para a contabilidade da SCMC.

Já os lotes das receitas compartilhadas por uma entidade de saúde privada ou subsistema são enviados à Associação Nacional de Farmácias (ANF) juntamente com o verbete de identificação do lote carimbado, três cópias do resumo do lote, e três cópias da fatura mensal, sempre anexados aos lotes correspondentes de cada entidade de saúde privada ou subsistema. Para além disto, também é enviado à ANF uma cópia do receituário do SNS, bem como das NC do SNS.

Após a receção dos lotes, o CCF apura os valores das participações realizadas e esse valor é pago à farmácia. Se alguma receita não for aceite, o valor da participação dessa receita não é pago à farmácia.

Medição de parâmetros bioquímicos e fisiológicos: A FMC possui um laboratório para medição do colesterol, triglicérideos, glicémia e pressão arterial, bem como administração de soluções injetáveis. A maioria das medições que realizei foram de pressão arterial e medição da glicémia, havendo certos utentes que se deslocavam regularmente à farmácia para medirem estes valores, principalmente a pressão arterial. Isto permitiu-me acompanhar o estado de saúde dos utentes, aconselhando medidas não farmacológicas para estabilizarem estes parâmetros, bem como direcioná-los para o médico quando os valores apareciam fora do normal.

### *2.1.3. Farmácia direcionada para grupos de risco*

A maioria dos utentes que vinham à FMC eram idosos, o que me permitiu estar em contato com utentes que apresentavam diversas comorbidades, como hipertensão, diabetes e colesterol elevado, o que resultava na toma de diversos medicamentos ao mesmo tempo, aumentando o risco de interações farmacológicas, bem como falta de aderência à terapêutica. Foi necessário, nestas situações, ter um maior cuidado e atenção a explicar a medicação ao utente, bem como ouvir cuidadosamente a informação transmitida pelo utente, pois várias vezes percebia que, o utente em questão, não tomava a medicação da forma prescrita pelo médico.

Para além dos idosos, também apareciam grávidas ou recém mães a pedirem PCHC, o que permitia a venda cruzada (ou *Cross-Selling*) com outros produtos da mesma gama, tendo sempre em atenção as necessidades da mãe. Também era comum aparecerem mães com receitas para os seus filhos menores ou então com questões sobre que medicamentos o seu filho podia tomar ou não. Nestas situações foi necessário ter em atenção a idade da criança, de forma a garantir sempre a segurança desta; para tal, antes de aconselhar algum medicamento ou PCHC, eu debatia a situação com outro farmacêutico da equipa técnica e aconselhava a solução a que tínhamos chegado.

Esta situação particular da FMC permitiu-me ter uma maior experiência com estes grupos de risco, aumentando a minha confiança e conhecimento, no meu futuro aconselhamento destes grupos de risco.

#### 2.1.4. *Estagiária Única*

O facto de ser a única estagiária da FCM permitiu-me ter uma maior atenção por parte da equipa técnica. Para além disso, consegui ter uma maior independência na farmácia, sempre sob controlo e vigilância do DT ou Farmacêutico Adjunto, pois era responsável por diversas funções na farmácia e, caso alguma coisa ficasse mal feita, eu era responsabilizada pelo que fazia. Para além disso, também me integrei mais rapidamente na equipa técnica, o que me permitiu melhorar a minha relação profissional com eles.

## 2.2. Fraquezas

### 2.2.1. *Conhecimentos reduzidos das marcas comerciais*

Durante a formação académica, desenvolvemos mais a nossa capacidade de análise de casos clínicos, utilizando a denominação farmacológica ao invés da denominação comercial dos medicamentos. Muitas vezes, eu sabia qual a substância ativa que queria aconselhar, mas não sabia que produtos existiam na farmácia que continham essa substância ativa. O oposto também acontecia quando o utente me apresentava a receita, que apenas indicava as substâncias ativas, e me pedia o *Wellbutrin XR*<sup>®</sup>, por exemplo.

No entanto, no último mês de estágio, já tinha decorado algumas marcas comerciais e já conseguia responder ao utente com mais rapidez e certeza.

### 2.2.2. *Dificuldade no aconselhamento em Dermocosmética*

A maior dificuldade que senti durante o período de estágio, foi o aconselhamento de produtos de Dermocosmética. A formação académica nesta área é muito reduzida, uma vez que a cadeira de Dermofarmácia e Cosmética está muito mais direcionada para a produção

industrial, deixando de parte o aconselhamento farmacêutico e o conhecimento das diversas marcas existentes, bem como das suas indicações e usos.

No entanto, qualquer dúvida que tinha era colocada à restante equipa técnica, que me tentava explicar, de uma forma sucinta, as diversas marcas existentes e quais os seus usos, bem como o melhor aconselhamento a fazer, tendo em conta cada situação específica.

### 2.3. Oportunidades

#### 2.3.1. *Participação / Realização de diversas Formações*

O que mais me ajudou, ao longo deste estágio, a nível de aconselhamento foi as diversas formações realizadas na farmácia. Tive acesso a diversas plataformas de formação, como por exemplo, *Emforma* da *Angelini*<sup>®</sup>, *Learning to Care* da *Pierre Fabre*<sup>®</sup> e *Cosmética Activa*, que englobava um conjunto de marcas como por exemplo a *La Roche Posay*<sup>®</sup>. Para além disso, também recebi formação de diversos produtos vendidos na farmácia, através dos delegados comerciais das marcas que visitavam a farmácia.

Isto permitiu-me melhorar o meu aconselhamento, bem como as minhas tentativas de cross-selling, uma vez que conhecia os produtos melhor direcionados para situações específicas que apareciam na farmácia.

#### 2.3.2. *Preparação de Manipulados*

Na FMC são realizados, maioritariamente, dois tipos de manipulados: Vaselina Salicilada e solução alcoólica de Ácido Bórico à Saturação, sob controlo do responsável dos manipulados, neste caso era o Farmacêutico Adjunto. Todos os manipulados realizados eram depois revistos pelo DT, efetuando assim um duplo controlo de qualidade. Os manipulados de Vaselina Salicilada realizados ao longo do estágio, apresentavam concentrações de 20% e 30%. A estas concentrações, o ácido salicílico, presente na pomada, apresenta propriedades queratolíticas, sendo então utilizada no tratamento tópico de quadros de hiperqueratose e descamação da pele, como calos e psoríase. Já os manipulados de solução alcoólica de Ácido Bórico à Saturação são utilizados para o tratamento tópico de otites externas, devido à ação bacteriostática do ácido bórico nesta concentração.

Ao longo do estágio realizei 1 manipulado de solução alcoólica de Ácido Bórico à Saturação e 2 manipulados de Vaselina Salicilada. Para a preparação de manipulados foi necessário preencher a ficha de preparação, calcular as concentrações das matérias-primas e calcular o Preço de Venda ao Público (PVP) do manipulado. Para além disso, tive de aplicar os meus conhecimentos de Farmácia Galénica, principalmente na preparação da pomada, para que esta fosse aceite pelos critérios de controlo de qualidade.

## 2.4. Ameaças

### 2.4.1. *Medicamentos Esgotados e Rateados*

Atualmente, o principal problema das farmácias nacionais é a rutura de *stocks* de medicamentos. Muitos medicamentos considerados *life saving* encontram-se esgotados, ou seja, existe rotura no laboratório produtor, ou rateados, ou seja, os armazéns contêm poucas quantidades do medicamento em questão, logo o seu envio para as farmácias vai ser residual.

Foram diversas as situações durante o meu estágio em que tive de comunicar, repetidamente aos utentes, que os medicamentos que tomavam encontravam-se esgotados. Isto prejudicava o utente, pois comprometia a sua adesão à terapêutica. No entanto, e sempre que possível, mostrávamos, ao utente, as alternativas disponíveis, como mudar de marca comercial ou passar a tomar genérico, deixando o utente livre de fazer a sua escolha.

### 2.4.2. *Receitas Manuais*

Apesar da maioria das receitas prescritas e recebidas na farmácia serem eletrónicas, ainda existem situações em que são prescritas receitas manuais. Este foi um obstáculo que tentei ultrapassar ao longo do estágio, pois é necessário ter em atenção um conjunto de pormenores. Para que a receita manual seja validada e aceite é necessário conter a vinheta e assinatura do médico, indicação da situação excecional para prescrição manual (falência informática, inadaptação do prescrito, prescrição ao domicílio e até 40 receitas/mês), regime especial de comparticipação (se aplicável), data de prescrição, presença de rasuras, entre outros.

No entanto, a minha principal dificuldade era tentar decifrar o que vinha prescrito na receita. Quando a letra era ilegível, pedia ajuda aos colegas da equipa técnica que já estavam mais habituados ao tipo de letra de certos médicos. No entanto, tentava sempre fazer um esforço para entender o que estava prescrito, confirmando sempre com a equipa técnica se os medicamentos que iria vender eram os corretos, considerando a receita. Para além disso, na farmácia estava implementada a técnica de duplo controlo para receitas manuais, ou seja, todas as receitas manuais eram conferidas por duas pessoas, antes de ser realizado o aviamento da medicação.

### 3. Casos Clínicos

#### 3.1. Tratamento da Diarreia

M.F. com cerca de 70 anos, deslocou-se à farmácia para aviar as suas receitas. Ao ser perguntando se necessitava de mais alguma coisa, M.J. pede duas caixas de *Imodium Rapid*<sup>®</sup>. Após algumas questões, é referido que apresenta diarreia de forma recorrente, tendo sempre tomada apenas *Imodium Rapid*<sup>®</sup>.

Apesar do pedido da utente, aconselhei também *Gut4*<sup>®</sup> 25 MM. Este suplemento alimentar apresenta 4 tipos diferentes de bactérias: *Lactobacillus acidophilus* (CUL-60 e CUL-21), *Bifidobacterium bifidum* (CUL-20) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* (CUL-34), que contribuem positivamente para o melhoramento da flora intestinal em situações agudas de diarreia<sup>3</sup>. Expliquei à utente os problemas associados à toma de *Imodium Rapid*<sup>®</sup>, como obstipação crónica<sup>4</sup>, bem como a necessidade de o organismo libertar as toxinas causadoras da diarreia. A utente concordou em levar o suplemento *Gut4*<sup>®</sup> 25MM e, para evitar a toma da *Imodium Rapid*<sup>®</sup>, aconselhei a toma de *Tasectam*<sup>®</sup>, 1 cápsula a cada 6 horas<sup>5</sup>, que é um dispositivo médico à base de tanato de gelatina, que reduz os sintomas associados à diarreia, principalmente a frequência e duração, nas primeiras 12h. Para além disso também aconselhei alguns tratamentos não farmacológicos, como a toma de muita água e restrição alimentar.

Passadas algumas semanas, M.F. volta à farmácia e informa que o suplemento *Gut4*<sup>®</sup> 25MM melhorou significativamente o seu estado de saúde, tendo obtido melhores resultados com a toma deste suplemento, comparativamente à toma exclusiva de *Imodium Rapid*<sup>®</sup>.

#### 3.2. Tratamento da Rinite Alérgica

L.C. com cerca de 35 anos, dirige-se à farmácia com o objetivo de comprar um anti-histamínico. Após algumas perguntas, cheguei à conclusão de que o utente apresentava sintomas consistentes com alergia sazonal e rinite alérgica.

Indiquei a toma de *Claritine*<sup>®</sup> comprimidos de 10mg, que já passou a MNSRM-EF, cujo princípio ativo é a loratadina, um anti-histamínico com atividade antagonista sobre os recetores H1 periféricos<sup>6</sup>. Aconselhei a toma de 1 comprimido por dia, na altura do dia mais conveniente ao utente. Para além disso, e a pedido do utente, indiquei um descongestionante nasal que fosse também hidratante. Aconselhei, portanto, o *Septanasa*<sup>®</sup>, que apresenta na sua constituição, cloridrato de xilometazolina e dexpentanol. O cloridrato de xilometazolina é um agente simpaticomimético alfa-adrenérgico que provoca vasoconstrição nas mucosas nasais; já o dexpentanol é um análogo alcoólico do ácido pantoténico que provoca proteção e

hidratação nas mucosas<sup>7</sup>. Aconselhei a realização das pulverizações nasais apenas quando necessário, num máximo de 3 pulverizações em cada narina por dia.

### 3.3. Tratamento da sintomatologia da Varicela

P.R. com cerca de 35 anos, dirige-se à farmácia com a sua filha de 6 anos, apresentando uma receita de *Caladryl*<sup>®</sup> solução, para aplicar na sua filha, que apresentava sintomas provocados pelo vírus *Herpes Varicella Zoster*.

Para melhorar o tratamento sintomatológico, indiquei também *Atoderm*<sup>®</sup> *SOS Spray*, da marca *Bioderma*<sup>®</sup>, que contém extrato de Ambora e Chá Verde, em combinação com ingredientes calmantes como a Enoxolona, que permite acalmar o prurido associado a este tipo de virose, em 60 segundos<sup>8</sup>. Aconselhei o uso do *Atoderm*<sup>®</sup> *SOS Spray* em associação com o tratamento prescrito pelo médico, até ao desaparecimento dos sinais e sintomas de Varicela.

## 4. Conclusão

Com este estágio pude ter um maior contacto com o utente, ouvindo as suas queixas e analisá-las, aconselhando o uso racional do medicamento e esclarecendo qualquer dúvida que o utente tivesse. O contacto com o utente idoso permitiu pôr em prática os meus conhecimentos de Farmacoterapia e Farmácia Clínica, analisando casos clínicos reais e aconselhando de melhorar forma, tendo em atenção as características específicas deste grupo.

Também consegui conhecer todas as funções do Farmacêutico dentro da FC, desde o trabalho em *back office*, como a sua função para um aconselhamento correto e esclarecedor, de forma a garantir uma ótima adesão à terapêutica, demonstrando sempre preocupação e interesse pelo utente.

Concluindo, ao longo do estágio tive a oportunidade de desenvolver as minhas capacidades técnicas e profissionais, adquiridas durante o curso, melhorando a minha função como farmacêutico e sempre tendo em conta a saúde e bem-estar do utente.

## 5. Bibliografia

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **A Farmácia Comunitária**. Áreas Profissionais. [Acedido a 24 de junho de 2019] <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>
2. Associação Portuguesa de Estudante de Farmácia (APEF) – **Farmácia Comunitária**. [Acedido a 24 de junho de 2019] <http://apef.pt/farmacia-comunitaria/>
3. FARMÁCIAS PORTUGUESAS – **GUT4 25MM**. [Acedido a 25 de junho de 2019] <https://www.farmaciasportuguesas.pt/catalogo/index.php/catalog/product/view/id/666374/s/gut4-adultos/category/333/>
4. INFARMED – **Resumo das Caraterísticas do Medicamento – Imodium Rapid**. (2016) [Acedido a 25 de junho de 2019] [http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=4444&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=4444&tipo_doc=rcm)
5. GRUPO AZEVEDOS – **Tasectan Cápsulas**. [Acedido a 27 de junho de 2019] [https://www.grupoazevedos.com/produtos/dispositivos-medicos/tasectan\\_capsulas](https://www.grupoazevedos.com/produtos/dispositivos-medicos/tasectan_capsulas)
6. INFARMED – **Resumo das Caraterísticas do Medicamento – Claritine**. (2018) [Acedido a 25 de junho de 2019]. [http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=1890&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=1890&tipo_doc=rcm)
7. INFARMED – **Resumo das Caraterísticas do Medicamento – Septanazal**. (2016) [Acedido a 25 de junho de 2019] [http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=595682&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=595682&tipo_doc=rcm)
8. BIODERMA – **Atoderm SOS Spray - Ação anti-prurido imediata**. (2018). [Acedido a 25 de junho de 2019] <https://www.bioderma.pt/produtos/atoderm/sos-spray>



## 6. Anexos

### Anexo I – Circular sobre o Registo de Psicotrónicos e Estupefacientes

Circular n.º 0609-2016

Lisboa, 09 de Março de 2016

Assunto: Registo de psicotrónicos e estupefacientes - envio de relatórios e cópias das receitas manuais digitalizadas

Exmo. Associado,

De acordo com a informação transmitida na Circular n.º 2219-2015, de 12 de Outubro, e as comunicações recentes do INFARMED relativas ao registo de medicamentos contendo substâncias estupefacientes ou psicotrónicas, relembramos os seguintes aspectos:

ESTUPEFACIENTES E PSICOTRÓPICOS - REQUISITOS DE ENVIO OBRIGATÓRIO AO INFARMED				
	COPIA DE RECEITAS MANUAIS	REGISTO DE SAÍDAS	MAPA DE BALANÇO	REGISTO DE ENTRADAS*
TABELAS I, II-B, II-C	Mensalmente Até ao dia 8 do mês seguinte	Mensalmente Até ao dia 8 do mês seguinte	Anualmente Até 31 de Janeiro do ano seguinte	Não se aplica (fica s/ efeito)
TABELAS III E IV (incluem as benzodiazepinas)	Não se aplica	Não se aplica	Anualmente Até 31 de Janeiro do ano seguinte	Não se aplica (fica s/ efeito)
<b>MANTER ARQUIVO DE TODOS OS DOCUMENTOS DURANTE 3 ANOS</b>				

\* Realçamos que os procedimentos a adoptar no que respeita à validação do receituário, dispensa e controlo destes medicamentos foram alterados ao nível do registo de entradas, que deixa de ter de ser efectuado.

Os relatórios (registos de saídas e mapas de balanço) e as cópias das receitas manuais digitalizadas devem ser enviados para o e-mail do INFARMED ([mapas\\_subcontroladas@infarmed.pt](mailto:mapas_subcontroladas@infarmed.pt)), tendo a farmácia que mencionar no assunto o nome e o código. Exemplos:

- Farmácia "nome" (código): receitas manuais (mês/ano)
- Farmácia "nome" (código): registo de saídas (mês/ano)
- Farmácia "nome" (código): mapa de balanço (ano)

Para apoiar este procedimento, informamos que o Sifarma permite o envio das listagens dos psicotrónicos por e-mail e sugere de uma forma automatizada o endereço de e-mail do INFARMED e o assunto com o qual o e-mail deve ser enviado, conforme instrução de trabalho em anexo.

Com os melhores cumprimentos,

Anexo:  
- Instrução de trabalho Sifarma

A DIRECÇÃO



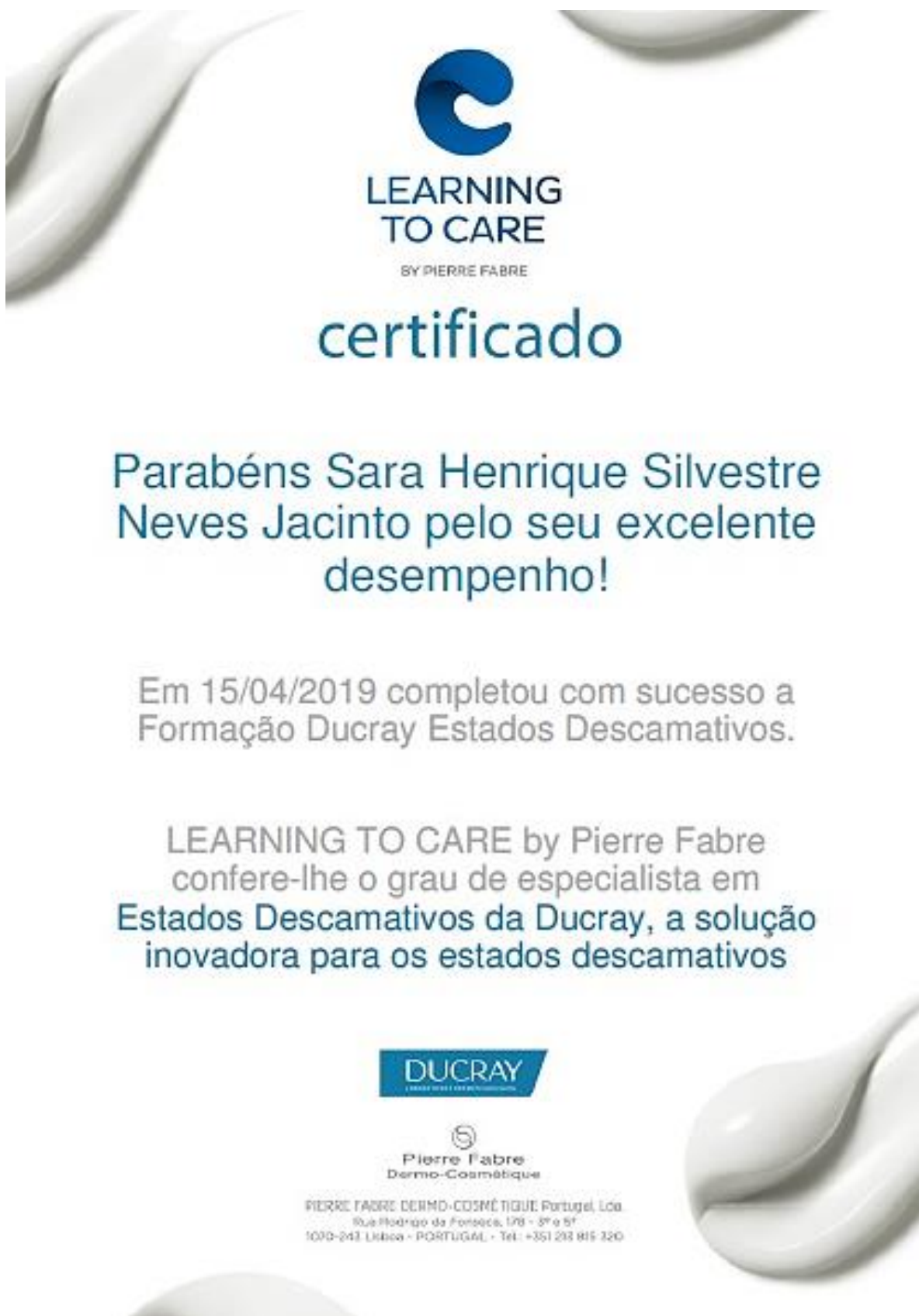
## Anexo 2 – Material necessário à preparação de Solução Alcoólica de Ácido Bórico à Saturação



## Anexo 3 – Material necessário à preparação de Vaselina Salicilada







Parte III – Processos Biotecnológicos Aplicados ao  
Transplante de Órgãos

## Resumo

A falta de órgãos para transplante é atualmente considerada um problema de saúde pública. As listas de espera para receber um órgão transplantado são cada vez maiores, para um número limitado de órgãos disponíveis para transplante. Tendo em conta que a maior parte dos órgãos transplantados provêm de doações pós-morte, não é expectável que a obtenção de órgãos pela fonte convencional venha a aumentar significativamente. Por outro lado, mesmo após a revolução decorrente da administração de imunossuppressores permanece o risco de rejeição do órgão transplantado. A este facto acresce que a terapia com imunossuppressores não é desprovida de efeitos secundários. Existem, no entanto, alternativas que fazem antever a resolução destes problemas e que têm por base procedimentos biotecnológicos, uns já estabelecidos e outros em investigação.

Entre as diferentes técnicas que têm vindo a ser desenvolvidas com vista à criação de órgãos destacam-se a utilização de células estaminais pluripotentes induzidas, provenientes dos doentes associadas a processos de decelularização-recelularização, a bio-impressão 3D e a transplantação de órgãos de outras espécies. A transplantação de órgãos de animais em humanos implica a remoção de vírus que pudessem provocar zoonoses, utilizando técnicas de modificação genética tais como a CRISPR-Cas9. No entanto, a perspetiva talvez mais promissora para ultrapassar a falta de órgãos, poderá ser a criação de quimeras, isto é, a produção de órgãos humanos em animais de produção tais como o porco, utilizando, igualmente, células estaminais pluripotentes induzidas e técnicas de modificação genética, mediadas pela CRISPR-Cas9.

Por outro lado, para ultrapassar o problema da rejeição do órgão, tem vindo a ser investigada a possibilidade de desenvolvimento de órgãos dadores universais. Pretende-se gerar tecidos e órgãos desprovidos do complexo de histocompatibilidade *major*, responsável pela resposta imune. Para este efeito recorre-se a processos biotecnológicos envolvendo quer a edição de genes quer ferramentas de transporte de sequências de ácidos nucleicos tais como os vetores virais. Espera-se que num futuro mais ou menos próximo venha a ser possível a criação de órgãos capazes de escapar à resposta imunológica alogénica do doente transplantado e em número suficiente para suprir as necessidades dos doentes reduzindo a respetiva mortalidade e melhorando a sua qualidade de vida.

**Palavras-Chave:** Transplante de Órgãos, células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs), Decelularização-Recelularização, Bio-impressão 3D, CRISPR-Cas9, edição de genes, quimeras, órgãos humanos em animais de produção, complexo de histocompatibilidade.

## **Abstract**

Nowadays, the lack of organs for transplantation is considered a public health issue. The waiting lists are growing larger and larger for the limited number of available organs for transplantation. Since the main source of organs for transplantation is from post-mortem donations, it can't be expected for rate of available organs to grow significantly. There's also the risk of organ rejection, even while using immunosuppressants. A use that sometimes can create more health problems and extra side effects for the patient.

However, there are alternatives, based on recent biotechnological procedures that could perhaps solve these issues. Amongst the different techniques that have been researched on and developed for the creation of organs, decellularization-recellularization and 3D bioprinting, using human induced pluripotent stem cells, stand out. Transplantation of animal organs in human implies the removal of virus that could lead to zoonosis, through genetic modification techniques, such as CRISPR-Cas9. Nevertheless, the most promising perspective to overcome the lack of organs could be the creation of chimeras. This is, the production of human organs in animals, such as pigs, using induced pluripotent stem cells and genetic modification techniques, mediated by CRISPR-Cas9.

On the other hand, to overcome the organ rejection issue, research has been done regarding universal donor organs. The idea is to create tissues and organs devoid of major histocompatibility complex, responsible for immune responses. For this, biotechnological processes involving either gene editing or nucleic acid sequences transporting tools such as viral vectors. We hope that in the future we'll be able to create enough organs capable of escaping the allogenic immune response of the transplanted patient and in a sufficient amount to reduce their necessities and the patient's mortality while improving their life quality.

**Keywords:** Organ Transplant, induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs), Decellularization-Recellularization, 3D Bioprinting, CRISPR-Cas9, gene editing, chimeras, human organs in livestock animals, histocompatibility complex.

## Lista de Abreviaturas

ADCC – Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpos

APC – Células Apresentadoras de Antígeno

B2M – Beta-2 Microglobulina

CRP – Proteínas Reguladoras do Complemento

DBD – Doação após Morte Cerebral

DCD – Doação após Morte Circulatória

dsDNA – DNA de dupla cadeia

ECM – Matriz Extracelular

EGFP – Proteína Fluorescente Verde

ESC – Célula Estaminal Embrionária

HDR – Reparação Dirigida por Homologia

HLA – Antígeno Leucocitário Humano

IFN- $\gamma$  – Interferão gama

IL – Interleucina

IMC – Massa Celular Interna

iPSC – Célula Estaminal Pluripotente Induzida

ITR – Repetições Terminais Invertidas

MAC – Complexo de Ataque à Membrana

MHC – Complexo de Histocompatibilidade *major*

MSC – Célula Estaminal Mesenquimatosa

NHEJ – Junção não Homóloga

PERV – Retrovírus Endógeno de Porco

rAAV – Vírus Adeno-associado Recombinante

RNAi – RNA de interferência

SCNT – Transferência Nuclear de Células Somáticas

sgRNA – RNA guia

ssDNA – DNA de cadeia simples

TCC – Complexo Terminal do Complemento

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral alfa

TR – Transcriptase Reversa

## **I. Introdução**

O transplante de órgãos é, na maioria das vezes, o único tratamento possível para os doentes que se encontrem nos estádios finais de insuficiência de órgãos, como por exemplo insuficiência cardíaca ou insuficiência hepática (OMS, 2019). No entanto, tem-se verificado que o número de doentes a necessitar transplante de órgãos é muito superior à quantidade de órgãos disponíveis para tal.

Até ao final de 2015, existiam na Europa, 59 mil doentes em lista de espera, sendo que, nesse mesmo período, apenas 33 mil órgãos foram transplantados em doentes em fase final de insuficiência de órgãos. No entanto, também na UE e durante o período de 2006 a 2015, a doação de órgãos aumentou 29%, tendo também aumentado a doação em vida em 56% e a doação após a morte em 21% (Comissão Europeia, 2019).

Segundo os dados disponíveis pelo Instituto Português do Sangue e da Transplantação (IPST), no primeiro trimestre deste ano foram registados 80 dadores, menos 1 dador do que em 2018, no mesmo intervalo de tempo. Também foram recolhidos menos 2 órgãos neste primeiro trimestre, comparativamente com o ano anterior, mas foi registada uma diminuição da idade média do dador, passando a ser de 51,6 anos. No entanto, foi registado um aumento no número de órgãos transplantados este trimestre, 212 órgãos transplantados até março deste ano, mais 17 que no ano anterior, observando-se assim uma taxa de utilização de 86% (IPST, 2019).

No entanto, mesmo que se concretize a transplantação, existem outros riscos associados que podem levar à inutilidade do órgão recebido. A rejeição imunológica é a principal causa de perda de função do órgão transplantado, podendo mesmo levar à necrose celular. A principal forma de evitar este problema é com a toma de imunossuppressores, que tem de ser realizada para o resto da vida, aumentando assim o risco de aparecimento de infeções (Stevens, 2017).

Porém, estão a ser desenvolvidas novas tecnologias, de forma a responder a todos estes problemas. O aparecimento da tecnologia da impressão 3D e de técnicas de clonagem, como a CRISPR-Cas9, abriram portas a uma nova era na criação de órgãos em laboratório, capazes de evitar a resposta imunológica e consequente rejeição do órgão. Espera-se que venham a permitir disponibilizar mais órgãos viáveis, reduzindo assim as listas de espera para transplante (Stevens, 2017).



## 2. Órgãos transplantados de Dadores

### 2.1. Tipos de doação de órgãos

Existem três tipos, atualmente reconhecidos, de doação de órgãos: doação viva, doação após morte cerebral (DBD) e doação após morte circulatória (DCD).

A **doação viva** ocorre quando uma pessoa voluntariamente doa um órgão ou parte deste a outra pessoa que dele necessita (UNOS, 2019). Na maioria das vezes, é doado um rim, mas também existe a possibilidade de doar parte do fígado. Esta categoria de doação pode ser dividida em três tipos (UNOS, 2019): a Doação Direta, onde o dador especifica a pessoa para a qual quer doar, como por exemplo um familiar ou amigo próximo. Esta situação é muito comum no transplante renal; a Doação Indireta, onde não é especificado o recetor do órgão e a correspondência entre o dador e o recetor é baseada na compatibilidade imunológica entre ambos; e a Doação Emparelhada, onde o candidato a transplante não apresenta compatibilidade com o dador que ele especificou (impossibilitando uma doação direta), mas pode demonstrar compatibilidade com o dador de outra doação direta incompatível. Ou seja, existe a troca de dadores entre dois pares incompatíveis para doação direta.

A **doação após morte cerebral** (DBD) ocorre após a confirmação de morte, através de critérios neurológicos, numa pessoa indicada como dadora de órgãos. Ou seja, após ser declarada morte cerebral (*brain death*) e não ocorrer qualquer estímulo neurológico quantificável no paciente, podem ser retirados os seus órgãos (Citerio *et al.*, 2016). Esta é a via de doação mais comum sendo, portanto, responsável pela maior parte dos órgãos doados atualmente (Citerio *et al.*, 2016; Snell *et al.*, 2018). Já na doação após morte circulatória (DCD), o dador ainda está vivo quando começa a ser considerada a hipótese de doação dos órgãos. Nesta particular situação, o paciente encontra-se em morte iminente quando é feito o primeiro contacto com a família para autorizar a recolha dos órgãos. No entanto, os órgãos só podem ser recolhidos após a inexistência de pulso periférico e cessação do fluxo sanguíneo (Citerio *et al.*, 2016; Morrissey e Monaco, 2014).

Para garantir a viabilidade do órgão, é mantida a oxigenação deste através de suporte de vida artificial e são realizadas diversas técnicas de otimização para garantir a qualidade do órgão para transplante (NHS Blood and Transplant, 2019). Mas apesar destes cuidados reforçados, certos estudos demonstraram a existência de diferenças entre os dois tipos de doação após morte que, podem levar ao aumento da gravidade dos *outcomes* negativos inerentes a este tipo de cirurgia, como por exemplo, a falta de oxigenação do órgão e a rejeição deste por parte do candidato a transplante (Loo, van *et al.*, 2017; Suylen, van *et al.*, 2017).

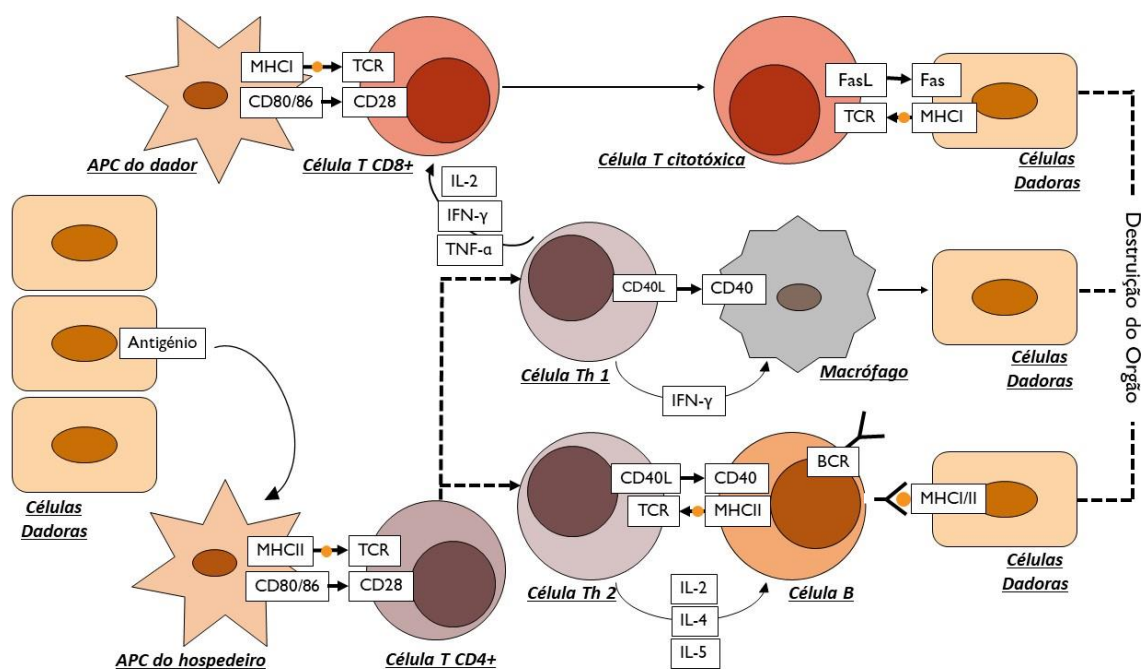
## 2.2. Problemas Associados

### 2.2.1. Rejeição do Órgão

Normalmente, as células imunitárias do nosso organismo reconhecem “corpos estranhos” que aparecem e reagem a estes, tentando-os eliminar através da ativação de diversos tipos de células e vias de sinalização. Estas células imunitárias reconhecem certas proteínas presentes no exterior destes corpos estranhos, denominadas complexos de histocompatibilidade *major* (MHC) (Cozzi, Colpo e Silvestro, De, 2017). Estes complexos, que são codificados pelo antígeno leucocitário humano (HLA), podem ser divididos em 2 tipos: MHC classe I, que estão presentes em todas as células nucleadas, e as MHC classe II, que estão apenas presentes em células apresentadoras de antígenos, como por exemplo, monócitos, macrófagos e células dendríticas. A rejeição imunológica do órgão transplantado ocorre de igual forma à resposta adaptativa a um “corpo estranho” no organismo, ativando os linfócitos T e B (Cozzi, Colpo e Silvestro, De, 2017).

Após o transplante do órgão, o sistema imunitário é ativado, levando à ativação das células dendríticas, que funcionam como células apresentadoras de antígenos (APC). Estas APC reconhecem os antígenos presentes nas células do órgão doado e migram para o nódulo linfático mais próximo, onde estão presentes as células T que irão dar origem à resposta adaptativa. Ao migrarem para o nódulo linfático, apresentam o antígeno estranho às células T CD4<sup>+</sup> (ou células T *helper*) que têm um recetor específico para as proteínas MHC classe II. Ao reconhecerem este “corpo estranho”, as células T CD4<sup>+</sup> diferenciam-se em células Th1 e Th2. Quando ativadas, as células Th1 libertam diversas citocinas como interleucina-2 (IL-2), interferão- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) (ver Figura 1). Isto resulta numa proliferação das células Th e indução de mais recetores MHC classe II nas APC do próprio, bem como a libertação de mais citocinas pró-inflamatórias (Ali *et al.*, 2013; Cozzi, Colpo e Silvestro, De, 2017; Lin e Gill, 2016; Moreau *et al.*, 2013).

Ao mesmo tempo, as células T CD8<sup>+</sup> (ou células T citotóxicas) reconhecem os antígenos apresentados pelo órgão doado, através de recetores específicos para as proteínas MHC classe I. Após este reconhecimento, as células T CD8<sup>+</sup> libertam perforina e granzimas que induzem a apoptose das células não-próprias. Para além disso, a apoptose também pode ser induzida através da ligação do ligando Fas da célula T CD8<sup>+</sup> ao recetor Fas da célula alvo.



**Figura 1:** Diagrama dos diversos mecanismos de rejeição de um órgão transplantado. (Adaptado de Cozzi, Colpo e Silvestro, De, 2017).

Este mecanismo de rejeição leva, portanto, a dano celular grave que se manifesta de diversas formas e se altera com o tempo. A rejeição hiperaguda desenvolve-se minutos após o transplante e deve-se à presença de anticorpos antidador no órgão transplantado. É por esta razão que são realizados os testes de compatibilidade genética entre o doador e o candidato a transplante, de forma a evitar este tipo de rejeição (Moreau *et al.*, 2013). De seguida pode ocorrer a rejeição aguda que se desenvolve entre uma semana a vários meses após o transplante e se deve à resposta imunológica das células T e células B do recetor do órgão. É, portanto, necessária a toma de imunossuppressores, de forma a evitar esta resposta imunológica e consequente perda do órgão. Por fim, pode ocorrer a rejeição crónica, que ocorre meses após o transplante e é mediada por mecanismos relacionados com as células de memória e os anticorpos existentes no organismo. Esta é a principal causa de rejeição do órgão (Ali *et al.*, 2013; Lin e Gill, 2016; Moreau *et al.*, 2013).

### 2.2.2. Administração de Imunossuppressores

Como dito anteriormente, a administração de imunossuppressores é essencial para garantir a viabilidade do órgão, bem como o sucesso do transplante em si. Como tal, a toma destes medicamentos deve ser realizada de forma crónica pelo doente. Os imunossuppressores atualmente utilizados podem ser divididos por diferentes classes, sendo as principais: imunossuppressores direcionados para as células T, imunossuppressores direcionados para as

células B e imunossuppressores direcionados para as citocinas (Holt, 2017; Wiseman, 2016), (ver Tabela 3).

**Tabela 3:** Mecanismos de Ação e Efeitos Adversos dos Imunossuppressores

<b>Imunossuppressores</b>				
	<b>Agente</b>	<b>Mecanismo de Ação</b>	<b>Efeitos Adversos</b>	<b>Referências</b>
Terapia direcionada às células T	Ciclosporina e Tacrolimus	Supressão da síntese de IL-2 através da inibição da calcineurina intracelular	Nefrotoxicidade, com efeitos dependentes da dose	Holt, 2017; Wiseman, 2016; D.C. e C.H., 2009
	Abatacept e Belatacept	Diminuição da resposta das células T, através do bloqueio da coestimulação CD80/86 (APC) com CD28 (células T)	Anemia, leucopenia, diarreia, infecções do trato urinário, edema e proteinúria	Holt, 2017; Wiseman, 2016; D.C. e C.H., 2009
Terapia direcionada às células B	Rituximab, Ocrelizumab, Ofatumumab e Veltuzumab	Inibição da proteína CD20, resultando na inativação e indiferenciação das células B	Aumento do risco de síndrome de lise tumoral, reações mucocutâneas e morte	Holt, 2017; Wiseman, 2016; D.C. e C.H., 2009
	Bortezomib	Inibidor seletivo reversível do proteossoma 26S dos plasmócitos, impedindo o “turnover” de proteínas específicas, levando a morte celular por apoptose	Neuropatia periferal, citopenia, efeitos gastrointestinais; no entanto, são dose-dependentes	Holt, 2017; Wiseman, 2016; D.C. e C.H., 2009
	Eculizumab	Anticorpo monoclonal humanizado direcionado para a proteína C5, inibindo a clivagem de C5 em C5a e C5b	Aumento do risco de sérias infecções por parte de bactérias Gram negativo.	Holt, 2017; Wiseman, 2016; D.C. e C.H., 2009
Terapia direcionada às citocinas	Costicosteroides	Inibição da transcrição das citocinas através do bloqueio dos fatores de transcrição, tais como NF- $\kappa$ B e proteína-1 ativadora	Diabetes, osteoporose, aumento de peso, hipertensão, hiperdislipidemia,	Holt, 2017; Wiseman, 2016; D.C. e C.H., 2009
	Basiliximab	Anticorpo monoclonal quimérico que se liga à subunidade $\alpha$ da IL-2, impedindo a proliferação de células T ativadas, prevenindo a rejeição aguda	-	Holt, 2017; Wiseman, 2016

No entanto, a toma de imunossuppressores a longo prazo pode conduzir ao aparecimento de diversos outros problemas de saúde, levando a uma fraca adesão à terapêutica por parte do paciente. Os problemas comuns a todos os medicamentos imunossuppressores são o risco aumentado para o aparecimento de infecções, risco de desenvolvimento de cancro e citotoxicidade, supressão da medula óssea e citopenia (D.C. e C.H., 2009).

O maior perigo para um recém-transplantado é o aparecimento de uma infeção dado que os imunossuppressores impedem o organismo de se defender, aquando do aparecimento de uma bactéria ou vírus no organismo. Estas infeções podem ser adquiridas na comunidade ou partirem de organismos oportunistas. Para além deste risco, existe também uma maior probabilidade de aparecimento de cancro em pacientes que tomam imunossuppressores. Os recém-transplantados devem realizar rastreios regulares para despiste de cancro. Por fim, com certos tipos de imunossuppressores pode ocorrer supressão da medula óssea, com consequente citopenia. Isto gera baixos níveis de neutrófilos e plaquetas, que podem levar a problemas de coagulação e enfraquecimento do sistema imunitário. Como tal, recém-transplantados devem realizar análises frequentemente (D.C. e C.H., 2009). Para além destes problemas mais comuns, existem problemas mais específicos associados aos diferentes tipos de imunossuppressores, resumidos na Tabela 3.

### 3. Órgãos produzidos em laboratório com recurso à bioengenharia

#### 3.1. Decelularização-recelularização

Na criação de órgãos através da bioengenharia, é necessário um molde ou suporte (*scaffold*) onde as células se possam desenvolver e crescer, de forma a criar um órgão completo e funcional. Esse molde pode ser obtido através da remoção de todas as células presentes no órgão, deixando para trás uma complexa mistura de proteínas funcionais e estruturais denominada de matriz extracelular (ECM) (Welman *et al.*, 2015). Esta matriz é geralmente conservada entre espécies e a sua transplantação é tolerada pelo hospedeiro. Este processo de remoção pode ser denominado de decelularização (Gilbert, Sellaro e Badylak, 2006).

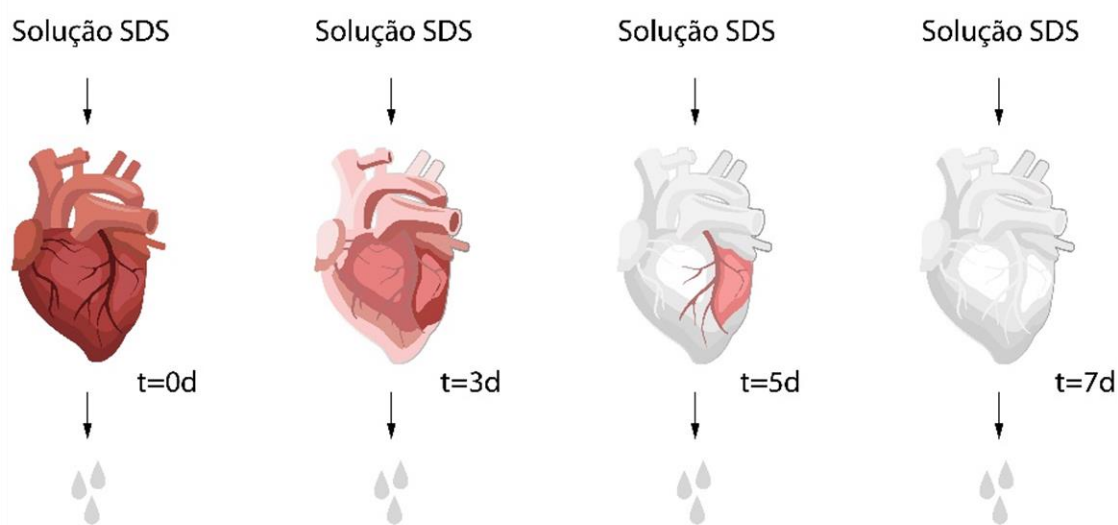
Para realizar a decelularização, é necessária, uma combinação de tratamentos físicos e químicos, que permitem a remoção de todo o material celular e nuclear ao mesmo tempo que é mantida a composição, atividade biológica e integridade mecânica da ECM. Os tratamentos físicos incluem agitação ou sonicação, massagem mecânica ou até congelação e permitem a ruptura da membrana celular, libertação do conteúdo citoplasmático e consequente lavagem e remoção de todo o conteúdo celular da ECM. No entanto, estes tratamentos são insuficientes para retirar todo o material, sendo, portanto, necessário o uso de compostos químicos. Os tratamentos químicos e enzimáticos têm como função quebrar as membranas celulares e as ligações inter e extracelulares. Para tal são utilizados compostos como a tripsina, detergentes e soluções iónicas (Gilbert, Sellaro e Badylak, 2006).

Para a realização deste processo é necessário um protocolo que geralmente começa com a lise da membrana celular através de tratamentos físicos ou químicos, seguido da separação dos componentes celulares da ECM utilizando enzimas, solubilização do citoplasma e componentes nucleares com detergentes e, por fim, remoção dos detritos celulares do tecido. A este processo pode ser adicionada agitação mecânica para aumentar a sua efetividade. Para proteger o recetor de qualquer resposta imunológica, todos os resíduos químicos devem também ser removidos (Gilbert, Sellaro e Badylak, 2006).

Em 2008, Ott *et al.* publicaram um protocolo de decelularização num coração cadavérico de rato. Para o efeito utilizaram SDS, polietilenoglicol (PEG) e Triton-X100, tendo sido o primeiro aquele que demonstrou melhores resultados. As proteínas presentes na ECM foram mantidas e as características estruturais foram preservadas (Ott *et al.*, 2008).

Já em 2014, Guyette *et al.* adaptaram este protocolo e aplicaram-no a pulmões, coração e rins de ratos, porcos e humanos, neste caso frescos ou armazenados em gelo durante 24h.

Utilizaram os mesmos agentes de decelularização e chegaram à mesma conclusão de que o SDS era o agente que demonstrava melhores resultados (Guyette *et al.*, 2014) (ver Figura 2).



**Figura 2:** Ilustração da fase de lavagem com solução SDS do processo de decelularização. A ilustração demonstra o intervalo de tempo necessário para retirar todas as células de um coração humano. (Adaptado de Guyette *et al.*, 2014)

No entanto, para obtermos um órgão viável para transplante, é necessário pegar nesta matriz e re-introduzir as células necessárias ao seu normal funcionamento. Este processo é denominado recelularização.

A recelularização baseia-se em três princípios-chave: obtenção de uma fonte renovável de células, semear (*seeding*) as células na matriz e produção do órgão específico. O primeiro objetivo é identificar uma fonte de células que seja renovável e aprovada a níveis éticos. As principais utilizadas são células adultas e fetais, células estaminais embrionárias (ESC), mesenquimatosas (MSC) e pluripotentes induzidas (iPSC) (Welman *et al.*, 2015).

Para introduzir as células são utilizadas duas técnicas: introdução através de perfusão por via vascular ou por via não-vascular. Ambas têm demonstrado bons resultados, no entanto, para melhorar a concentração celular e a sua difusão ao longo da matriz, é aconselhada a utilização de múltiplas vias de perfusão, bem como, a realização de ajustes na velocidade de perfusão e otimização no revestimento da matriz. No entanto, a técnica e o método utilizados são muito específicos para o tipo de órgão em questão, e diferem bastante de órgão para órgão (Scarrit, 2015; Welman *et al.*, 2015).

Após introdução das células é necessário produzir o órgão, no seu todo. Para tal, as células têm de se dividir e multiplicar para repovoar toda a ECM mas, só o conseguem fazer com acesso a nutrientes e oxigénio. Para a cultura de órgãos provenientes da bioengenharia é

necessário, portanto, o uso de biorreatores, que auxiliam no transporte desses mesmo nutrientes (Scarrit, 2015; Wang *et al.*, 2017).

Estes biorreatores devem ser capazes de fornecer os nutrientes necessários para o desenvolvimento do órgão, bem como de medir diversos parâmetros bioquímicos e corrigi-los quando necessário. Para além disso, podem fornecer estímulos específicos ao tipo de órgão de forma facilitar a manutenção dos fenótipos ou a promoção da diferenciação das células (Scarrit, 2015; Wang *et al.*, 2017).

### 3.2. Bio-impressão 3D

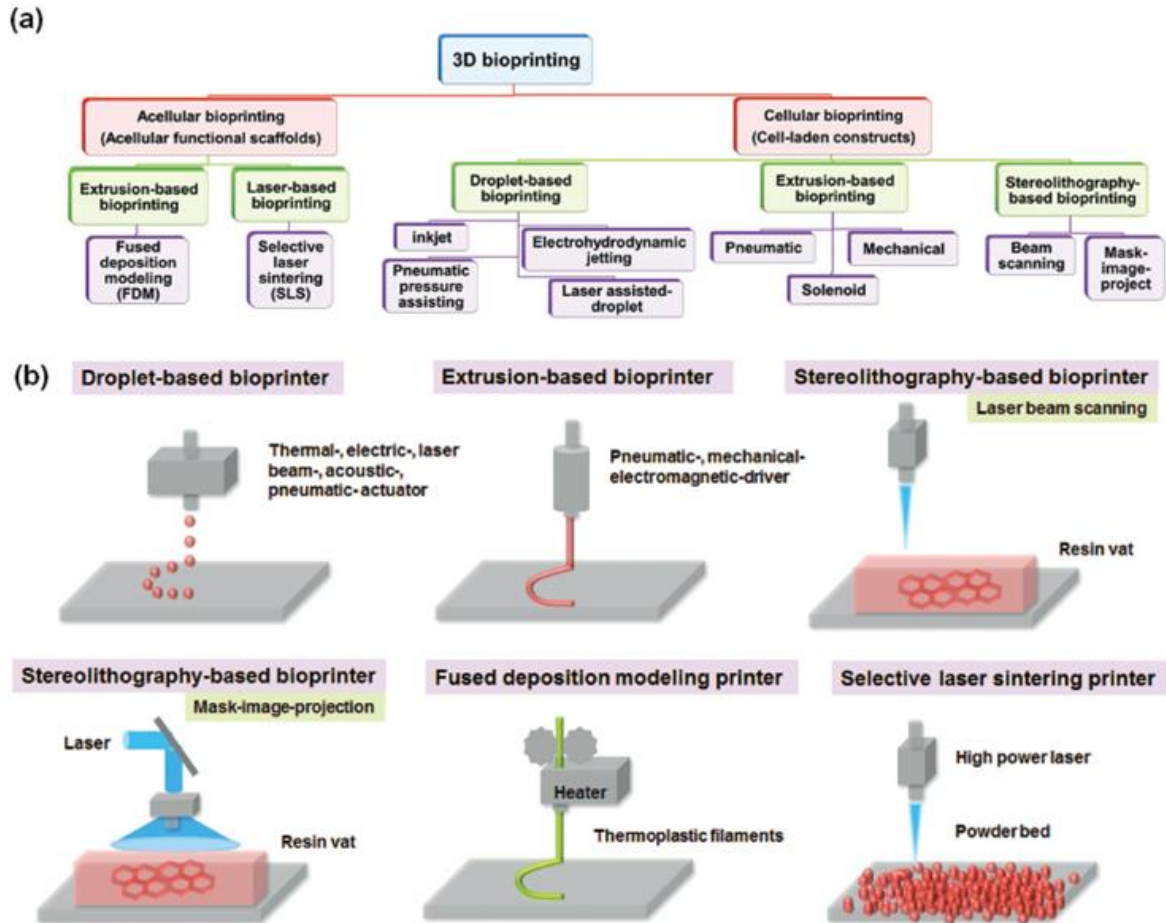
Na técnica de impressão 3D é recriado um modelo digital, camada por camada e em tempo real, utilizando materiais específicos, normalmente um polímero, e uma impressora adequada para a técnica. A técnica de impressão 3D apenas altera o tipo de material utilizado, passando a ser material biológico, como as células. Como dito anteriormente, esta técnica necessita de 3 componentes principais: uma impressora 3D, um ficheiro do modelo 3D e tinta, sendo que, neste caso, a “tinta” utilizada é material biológico, como células ou componentes bioativos (Cui *et al.*, 2017).

Normalmente o processo de impressão é realizado em 3 fases: pré-impressão, impressão e pós-impressão. Na pré-impressão, é criado o modelo digital 3D e escolhido o tipo de biomaterial a utilizar, tendo em conta a estrutura 3D que tencionamos “imprimir”. Esta estrutura 3D é desenhada de forma a ser específica adaptada ao doente e é impressa camada por camada, através da deposição do material biológico. Após a impressão do modelo 3D, é necessário desenvolver estruturas de suporte, bem como estimular as funcionalidades biológicas (Cui *et al.*, 2017; Mandrycky *et al.*, 2016; Murphy e Atala, 2014).

Na produção de tecidos orgânicos, esta técnica pode ser dividida em duas formas: com a incorporação ou sem a incorporação de células vivas impressas diretamente no modelo. As técnicas de bio-impressão celular permitem a deposição de material (*bioink*) constituído por células viáveis para formar uma estrutura 3D viva. Já a bio-impressão acelular proporciona um maior leque de escolhas no que diz respeito à regeneração de tecidos (Cui *et al.*, 2017; Mandrycky *et al.*, 2016; Murphy e Atala, 2014) (ver Figura 3). As diferenças e vantagens entre estas duas formas podem ser vistas no Anexo I.

A tinta utilizada nesta técnica tem presente, na sua constituição, células, biomateriais e sinais bioquímicos, que são necessários na construção de um órgão ou tecido viável. Apesar dos biomateriais poderem variar bastante no seu tipo e tamanho, na bio-impressão 3D, a principal função dos biomateriais é criar uma ECM capaz de organizar a regeneração tecidular,

substituir temporariamente as funções tecidulares e facilitar a integração com o recetor. Como tal, os biomateriais devem ser capazes de incorporar diferentes fatores bioquímicos, como citocinas e fatores de crescimento, que facilitem este processo (Cui *et al.*, 2017; Mandrycky *et al.*, 2016; Murphy e Atala, 2014).



**Figura 3:** (a) Diagrama em árvore das várias técnicas de bio-impressão 3D e (b) Ilustrações simplificadas de típicas técnicas de impressão 3D para regeneração de órgãos e/ou tecidos. (Retirado de: Cui *et al.*, 2017, com autorização do autor)

É também necessário ter em atenção o tipo de célula escolhido para o processo de impressão. As células escolhidas devem ser suficientes em número para se expandirem na cultura do molde, ser capazes de suportar o processo de impressão, ser capazes de se diferenciar e proliferar de forma controlada e precisa, ser capazes de replicar as funções celulares nativas, apresentar as especificações fisiológicas típicas dos diferentes tipos de células, e ser capazes de interagir com diferentes tipos de células para facilitar as interligações com o recetor. Normalmente, os tipos de células mais utilizados são as ESC e iPSC pois apresentam um menor risco de rejeição por parte do recetor (Cui *et al.*, 2017; Mandrycky *et al.*, 2016; Murphy e Atala, 2014).



### 3.3. Problemas associados

Relativamente à tecnologia de Decelularização-Recelularização, é necessário ter em atenção que, nem todos os protocolos apresentam níveis satisfatórios de efetividade. Certos protocolos conseguem preservar melhor a integridade estrutural e biológica da ECM, mas falham na total eliminação dos detritos celulares, bem como o oposto (Scarrit, 2015). Segundo Crapo *et al.*, um processo de decelularização deve terminar com menos de 50ng de dsDNA/mg no tecido remanescente e esses fragmentos de DNA devem ser inferiores a 200 pb. É, portanto, necessário encontrar um equilíbrio entre a integridade da ECM e a eliminação do conteúdo celular, de forma a reduzir ao máximo o risco de resposta imunológica e rejeição do órgão (Crapo, Gilbert e Badylak, 2011).

Também já foi demonstrado que, dependendo do protocolo utilizado, ocorre um risco de colapso da estrutura vascular presente na ECM, bem como alterações na elasticidade nativa da ECM, tornando-se, na maioria das vezes, mais rígida. Isto torna-se um problema grave quando o órgão em causa é o coração ou os pulmões (Scarrit, 2015).

Já com a tecnologia de bio-impressão 3D, para que o processo de cultura de órgãos funcione é necessária uma complexa rede vascular, para transportar os nutrientes e oxigénio necessários para o desenvolvimento celular. Sem esta rede, pode ocorrer necrose celular e a perda de viabilidade do órgão criado, e mesmo com terapêutica anticoagulante, podem ocorrer severos eventos tromboembólicos (Ko, Milthorpe e McFarland, 2007; Scarrit, 2015).

## 4. Órgãos produzidos em organismos por recapitulação do desenvolvimento embrionário

### 4.1. Órgãos provenientes de animais: xenotransplante

#### 4.1.1. O Porco como animal dador

Na gíria portuguesa, é costume dizer “se queres conhecer o teu corpo, abre um porco”, e tal tem alguma pertinência científica. Na verdade, o porco doméstico apresenta órgãos com tamanho e morfologia semelhante aos órgãos humanos, chegando a ser usadas as válvulas coronárias de porco para substituição das válvulas coronárias humanas (Casal e Williams, 2019; Cooper, Gollackner e Sachs, 2002). Mas esta não é a única razão pela qual o porco é o animal escolhido para estudos de xenotransplante. Apesar dos primatas não-humanos serem evolucionariamente mais semelhantes a nós, é quase impossível criá-los em cativeiro em grande escala, uma vez que, grande parte dos primatas não-humanos utilizados em estudos científicos, ainda são considerados *selvagens*. Os porcos caseiros já são criados em

cativeiro há muitos anos, sendo explorados pela indústria alimentar (Casal e Williams, 2019; Cooper, Gollackner e Sachs, 2002). Para além disso, a sua produção em grande escala é de baixo custo, uma vez que por cada gestação suína, podem nascer entre 6 a 12 leitões (Cooper, Gollackner e Sachs, 2002).

#### 4.1.2. Resposta Imunológica e Rejeição

Existem 3 tipos de rejeição relacionadas com a resposta imune do corpo ao órgão proveniente do porco: rejeição hiperaguda, rejeição tardia do transplante xenogénico e rejeição celular (Hryhorowicz *et al.*, 2017).

A principal causa de rejeição do transplante numa situação porco-humano é a presença do antígeno Gal ( $\text{Gal}\alpha 1,3\text{Gal}$ ) presente em glicoproteínas e glicolípidos existentes na superfície das células de porco. O antígeno Gal é formado quando a molécula de galactose se liga à N-acetilactosamina (N-lac) através da ligação  $\alpha 1,3$ -glicosido e envolvendo a enzima  $\alpha 1,3$ -galactosiltransferase (Boksa *et al.*, 2015; Cooper *et al.*, 2016; Hryhorowicz *et al.*, 2017; Meier *et al.*, 2018; Vadori e Cozzi, 2015). A reação dos anticorpos humanos com este antígeno provoca uma rejeição hiperaguda que leva a rejeição do órgão. A rejeição hiperaguda desenvolve-se alguns minutos após o transplante do órgão e leva inevitavelmente à sua rejeição. A ligação dos anticorpos ao antígeno Gal ativa o clássico sistema de complemento, o que leva à formação do complexo de ataque à membrana (MAC) (ou complexo terminal do complemento (TCC) constituído por C5b-C6-C7-C8-C9{n}) que age como um catalisador para a penetração de proteínas pela membrana celular, formando canais transmembranares, resultando na lise celular (Hryhorowicz *et al.*, 2017).

No entanto, em 2003 este problema foi ultrapassado, graças ao trabalho do grupo de Phelps *et al.* Este grupo conseguiu produzir porcos que não apresentam o gene responsável pela produção da  $\alpha 1,3$ -galactosiltransferase ( $\alpha 1,3\text{GT}$ ). Como dito anteriormente, esta enzima é responsável pela produção do antígeno  $\alpha 1,3$ -galactose ( $\alpha 1,3\text{Gal}$ ), principal causador da rejeição hiperaguda (Phelps, 2003).

O grupo começou por criar embriões de porco através do cruzamento entre um macho e uma fêmea de porco, ambos geneticamente modificados para apresentarem o genótipo heterozigótico de silenciamento do gene responsável pela  $\alpha 1,3\text{GT}$  (*knockout* (KO)). De seguida, o grupo isolou os fibroblastos fetais dos embriões e construiu um vetor KO do codão de iniciação (ATG) da  $\alpha 1,3\text{GT}$ , o pPL680, que permitiu silenciar o segundo alelo do gene  $\alpha 1,3\text{GT}$ . Para determinar quais das células foram eficazmente modificadas, o grupo transferiu os fibroblastos para uma cultura que continha a toxina A, uma toxina retirada da

bactéria *Clostridium difficile*. Esta toxina apresenta uma elevada afinidade para o antígeno  $\alpha 1,3\text{Gal}$ , presente na superfície das células. Ao ligar-se a estes antígenos, ocorre um efeito citotóxico que leva ao arredondamento e separação destas células das restantes. Esta técnica permitiu distinguir os fibroblastos que apresentavam um fenótipo  $\alpha 1,3\text{Gal}$  negativo dos que apresentavam um fenótipo  $\alpha 1,3\text{Gal}$  positivo. Com isto, o grupo conseguiu identificar uma colónia (680BI) em que 80% das células apresentavam fenótipo  $\alpha 1,3\text{Gal}$  negativo (Phelps, 2003).

Através da técnica de transferência nuclear de células somáticas (SCNT), os fibroblastos fetais foram transferidos para o útero de cinco porcas. Três gestações foram iniciadas, mas apenas uma ocorreu para além dos 35 dias. Esta última gestação foi terminada aos 39 dias e foram recolhidos quatro fetos. Destes fetos, foram isolados os fibroblastos (680BI-1 a BI-4) e foram analisados através de técnicas de fluorescência e coloração GS-IB4, que demonstraram a presença de uma linha celular  $\alpha 1,3\text{Gal}$  positivo (BI-3) e três linhas celulares  $\alpha 1,3\text{Gal}$  negativo (BI-1, BI-2 e BI-4) (Phelps, 2003).

Com o uso das técnicas de PCR e Southern Blot, o grupo verificou que nenhuma das linhas celulares  $\alpha 1,3\text{Gal}$  negativo apresentavam fragmentos de restrição, previsto pela técnica de disrupção direcionada através do vetor pPL680, apesar de apresentarem fenótipo negativo. Para identificar a causa da inativação do gene, o grupo clonou e sequenciou os cDNA do  $\alpha 1,3\text{GT}$  das quatro linhas celulares e descobriram que existia uma transversão T para G do segundo par de bases (pb) do exão 9 do segundo alelo do gene  $\alpha 1,3\text{GT}$  nas linhas celulares BI-1, BI-2 e BI-4 mas não na linha celular BI-3. O grupo teorizou, então, que seria esta mutação que levava à disrupção da função da  $\alpha 1,3\text{GT}$ . Para confirmar esta teoria, o grupo clonou os cDNA  $\alpha 1,3\text{GT}$  das linhas celulares num vetor de expressão e transferiu-os para células humanas HeLa, que não expressam a enzima  $\alpha 1,3\text{GT}$ . Através da técnica de coloração GS-IB4, verificaram que apenas as células transferidas com a linha celular BI-3 apresentavam o fenótipo  $\alpha 1,3\text{Gal}$  positivo, o que veio confirmar a teoria anteriormente referida (Phelps, 2003).

Por fim, o grupo voltou a realizar a SCNT com as três linhas celulares  $\alpha 1,3\text{Gal}$  negativo (ou seja, com o gene  $\alpha 1,3\text{GT}$  silenciado) e obtiveram cinco leitões que apresentavam disrupção do gene  $\alpha 1,3\text{GT}$  no primeiro alelo e mutação T->G na segunda pb do exão 9 no segundo alelo do gene  $\alpha 1,3\text{GT}$  (Phelps, 2003).

Para além da rejeição causada pelo antígeno Gal, também existem outros fatores que causam a rejeição hiperaguda, como por exemplo, as proteínas humanas reguladoras do complemento (CRPs) presentes nas células endoteliais vasculares. Apesar do porco também apresentar estas proteínas, estas são ineficientes em proteger as células do porco dos danos mediados pelo complemento humano. Para tal, os porcos devem ser geneticamente modificados através da introdução de transgenes para as CRP humanas, tais como CD46, CD55 e CD59 (Cooper *et al.*, 2016; Meier *et al.*, 2018; Vadori e Cozzi, 2015).

Um órgão transplantado xenogénico que evita a rejeição hiperaguda, está sujeito à rejeição tardia do transplante xenogénico, que ocorre entre algumas horas ou dias após o transplante. O decurso da rejeição tardia é muito semelhante ao da rejeição hiperaguda, com a diferença de não ativar o sistema de complemento; ao invés, ocorre a participação das imunoglobulinas IgG, desenvolvendo-se mais lentamente (Cooper *et al.*, 2016; Hryhorowicz *et al.*, 2017; Meier *et al.*, 2018; Vadori e Cozzi, 2015).

Durante esta rejeição, ocorrem também problemas de coagulação resultantes das diferenças moleculares entre os sistemas de coagulação do homem e do porco. A CD39 e CD73 são ectoenzimas presente no endotélio vascular e nas células sanguíneas, que têm um papel importante na formação do trombo e processo inflamatório. Visto, no porco, estas enzimas estarem subexpressas, a introdução dos genes hCD39 e hCD73 (enzima humana) nas células transplantadas do porco pode levar a uma redução significativa do risco de coagulação intravascular e consequente rejeição do órgão (Hryhorowicz *et al.*, 2017; Wheeler *et al.*, 2012).

A rejeição celular ocorre vários dias após o transplante. As principais características morfológicas desta rejeição são infiltrações de células mononucleares. No humano, a resposta celular provocada pelas células do porco é induzida pelas células NK e linfócitos T (Cooper *et al.*, 2016; Hryhorowicz *et al.*, 2017; Vadori e Cozzi, 2015). As células NK ativadas são capazes de destruir as células transplantadas, o que origina um efeito citotóxico tanto diretamente como através dos anticorpos (citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC)) (Boksa *et al.*, 2015).

#### 4.1.3. Situação atual

Para além dos obstáculos referidos anteriormente, existe também a questão do vírus PERV (retrovírus endógeno do porco), encontrado normalmente nas células de porcos e que, apesar de ser inofensivo neste animal, tem demonstrado, em laboratório, ser patogénico para o Humano.

O vírus PERV é um vírus de RNA, com envelope. O seu genoma é composto por sequências codificantes e não codificantes, estando, estas últimas presentes nas extremidades terminais do RNA. Na sequência codificante estão os genes *gag*, *pol* e *env*, que codificam, respetivamente o antigénio específico do grupo, a polimerase necessária à replicação e o envelope do vírus (Łopata *et al.*, 2018). O vírus PERV não pode ser eliminado mesmo em porcos criados com todos os cuidados de biossegurança. Existem várias dezenas de cópias do vírus PERV. O gene *pol* tem uma função semelhante à transcriptase reversa (TR), logo é essencial na replicação e infecciosidade viral (Yang *et al.*, 2015).

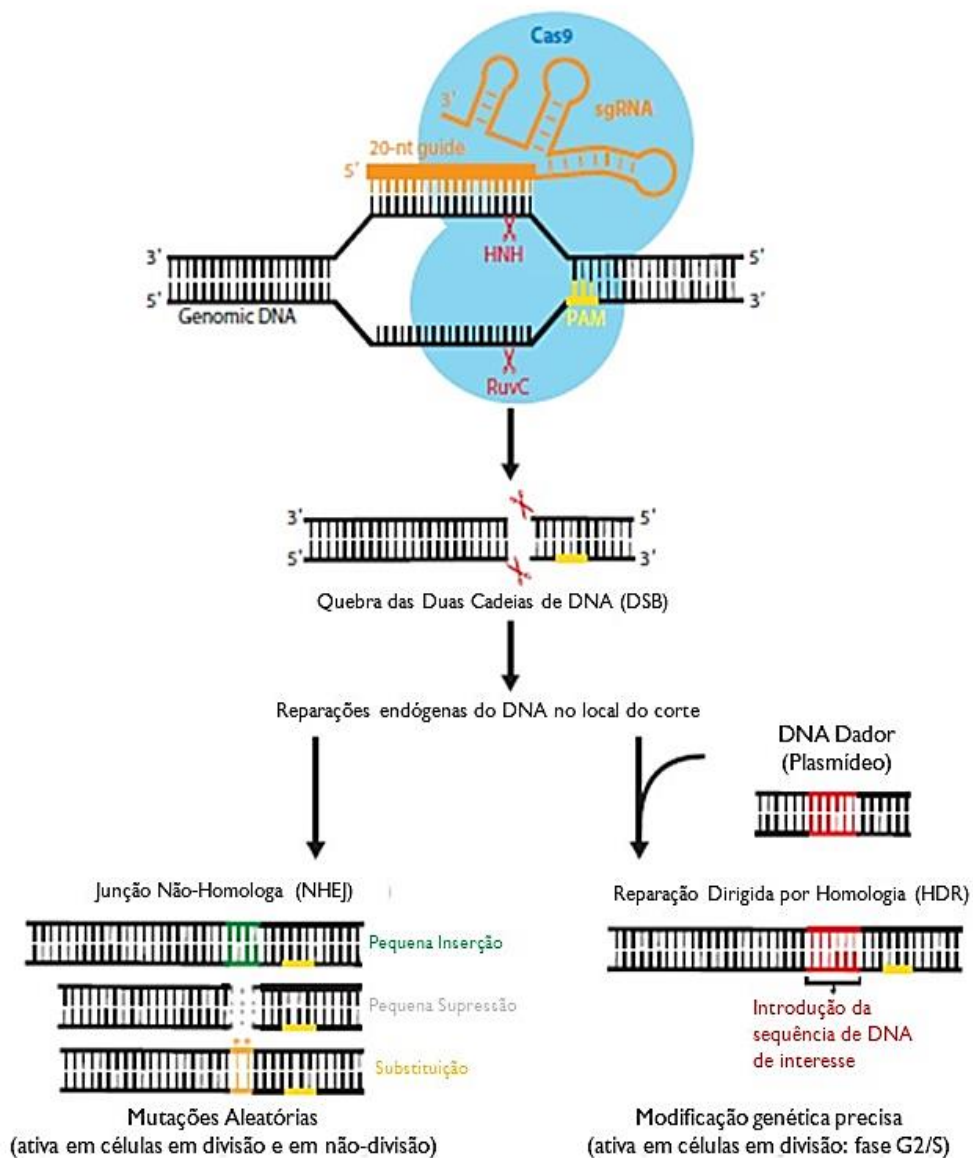
Já houve diversas tentativas para remoção do risco de transmissão do vírus PERV aos humanos tais como, RNAs de interferência (RNAi), vacinas e a eliminação permanente do vírus PERV através das nucleases *Zinc-Finger* e TALEN. Em 2015, um grupo de investigadores da Universidade de Harvard conseguiu, com sucesso, usar a CRISPR-Cas9 para inativar todas as cópias do gene *pol*, presentes no porco, e assim reduzir em 1000x a infetividade do vírus nas células humanas (Yang *et al.*, 2015).

A CRISPR-Cas9 é um complexo utilizado na edição genética, originalmente encontrado em bactérias como um sistema de defesa adaptativo contra a invasão de vírus. O complexo CRISPR-Cas9 é constituído por 2 componentes: uma proteína de corte do DNA (nuclease), a Cas9; e uma molécula de RNA, a *single-guide* RNA (sgRNA). Este complexo permite uma edição genética específica, pois o sgRNA é construído de forma a hibridizar com uma sequência específica do DNA que se quer cortar (Doudna e Charpentier, 2014; Jiang e Doudna, 2017).

O processo começa com a introdução do complexo CRISPR-Cas9 na célula e a sua entrada no núcleo. De seguida, o sgRNA reconhece uma pequena sequência no dsDNA, denominada de PAM, onde se liga, permitindo assim a ligação da Cas9. Ao ligar-se, o sgRNA desdobra a parte da dupla hélix que contém a sequência que o complementa, e liga-se a esta. Quando esta sequência específica é reconhecida a Cas9 corta o DNA, utilizando as duas nucleases presentes da proteína, a HNH e a RuvC, provocando uma quebra das duas cadeias de DNA (Doudna e Charpentier, 2014; Jiang e Doudna, 2017) (ver Figura 4).

Após o corte, a célula tenta reparar o dano realizado utilizando um de dois mecanismos: a junção não homóloga, mecanismo mais comum (*nonhomologous end joining* (NHEJ)) ou a reparação dirigida por homologia (*homology directed repairs* (HDR)). No entanto os processos de reparação, sobretudo a junção não homóloga mais comum, introduz erros de reparação no DNA. Com a ocorrência destes erros, ocorre introdução de codões stop,

inativação do gene escolhido, e conseqüente silenciamento. No entanto, como estes erros ocorrem de forma aleatória, diversos grupos de investigação têm vindo a tentar utilizar a reparação direcionada por homologia, fornecendo, em simultâneo com a Cas9 e sgRNA, um molde de dsDNA cujas extremidades são homólogas aos locais de corte, incluindo, entre estas, a seqüência correta que se pretende introduzir. Isto permite a reparação de genes mutados que levam ao aparecimento de doenças, substituindo a seqüência mutada pela seqüência genética não provocadora da doença (Doudna e Charpentier, 2014; Jiang e Doudna, 2017).



**Figura 4:** O mecanismo de engenharia genética mediada pela CRISPR-Cas9. O *single-guide RNA* (sgRNA) direciona a endonuclease Cas9 para uma seqüência específica de DNA e guia a Cas9 a introduzir um corte simultâneo nas duas cadeias de DNA (*Double strand break* - DSB) na seqüência alvo. Essa DSB é reparada através de mecanismo de reparação de DNA mediados pelo hospedeiro. Quando não existe uma seqüência de DNA template para reparar o corte, a reparação dá-se por junção não homóloga (ou *nonhomologous end joining* - NHEJ), um

processo pouco preciso que predispõe para erros de reparação que consistem na inserção ou deleção de nucleótidos (*indels*) e consequente produção de codões stop e consequente inativação do gene. Quando existe uma sequência de DNA molde ou *template*, em células em divisão pode ocorrer a reparação induzida por homologia ou *homology directed repair* (HDR), que é menos suscetível a erros aleatórios. Este último método de reparação permite realizar modificações precisas de genes, como gene *knock-in*, deleções e correções, através da recombinação homóloga. (Adaptado de: Jiang e Doudna, 2017, com autorização do autor)

Para desenhar o RNA guia (sgRNA) que permita que a Cas9 se ligue especificamente ao vírus PERV, Yang *et al.* analisou diversas sequências genómicas deste vírus e de outros retrovírus endógenos do porco. Com esta análise identificaram 62 cópias do vírus PERV, presente em células PK15 (linha celular epitelial renal de porco), e desenharam dois sgRNA que se ligaram à parte *pol* do gene do vírus PERV (Yang *et al.*, 2015).

Experiências iniciais demonstraram uma edição ineficiente do vírus PERV, razão pela qual os investigadores decidiram usar o sistema de transposição *piggybac* (Wilson, Coates e George, 2007) para entregar a Cas9 e a sgRNA às células PK15. Induções contínuas de Cas9 levaram ao aumento da frequência do direcionamento para o vírus PERV, alcançando um máximo de 37% (23 cópias do vírus PERV por genoma) observado no dia 17. No entanto, o aumento do tempo de incubação ou da concentração da Cas9 não levaram ao aumento do direcionamento, provavelmente devido à toxicidade não específica da CRISPR-Cas9 no DNA (Yang *et al.*, 2015).

De seguida o grupo pesquisou as linhas celulares que apresentavam o direcionamento com maior eficiência para o vírus PERV, através de genotipagem. Conseguiram em seguida isolar as linhas celulares das células PK15 que apresentavam elevada eficiência através de técnicas de sequenciação. Verificou-se que 10% dos clones apresentavam elevados níveis de disrupção do vírus PERV (97%-100%). Isto sugere que os clones apresentavam células onde a CRISPR-Cas9 foi altamente expressa (Yang *et al.*, 2015). Este grupo também verificou que, a estratégia utilizada para a edição genética, com a Cas9, não provocou instabilidade genética observável, e não foi encontrada atividade remanescente da transcriptase reversa, nos clones modificados da linha celular PK15, o que sugere que as células editadas produzem quantidades mínimas do vírus PERV (Yang *et al.*, 2015).

Após este estudo, o mesmo grupo tentou adaptar esta tecnologia para criar as primeiras crias de porco, totalmente livre do vírus PERV. Primeiro adotaram a técnica de edição genética para inativar a atividade do vírus PERV numa linha celular de fibroblastos suínos, introduzindo depois esses fibroblastos modificados em embriões, através de SNCT,

transferindo esses embriões para o útero de diversas porcas (Niu *et al.*, 2017). Para a criação de porcos 100% livres do vírus PERV, foi necessária a criação de células suínas primárias desprovidas deste vírus. Para tal, foi utilizada a técnica de edição genética, referida no estudo anterior, para inativar a atividade do vírus PERV numa linha celular primária de fibroblastos fetais suínos, denominada de FFF3 (Niu *et al.*, 2017).

Inicialmente, o grupo tentou mapear e caracterizar a presença do vírus PERV no genoma da FFF3, onde foram detetadas 25 cópias funcionais do gene *pol* do vírus PERV (10 do PERV-A e 15 do PERV-B). Para inativar estas cópias do vírus, foram desenhadas duas sgRNA específicas para o gene *pol* do PERV. Durante 12 dias, o grupo tratou as células FFF3 com as duas sgRNA, observando uma inativação do gene em 37% (Niu *et al.*, 2017). Seguidamente, o grupo realizou a sequenciação do RNA de FFF3 inativados e confirmaram que todas as transcrições do gene *pol* tinham mutado. Para além disso, não foi detetada qualquer atividade da transcriptase reversa, demonstrando que nenhuma partícula viral foi produzida pela FFF3. Verificaram também que nenhuma célula FFF3 apresentava macrosupressões induzidas pela Cas9, concluindo assim ser possível a produção de FFF3 PERV-inativados sem alterações estruturais genéticas detetáveis (Niu *et al.*, 2017).

Por fim, o grupo produziu embriões PERV-inativados através da técnica SCNT, que foram depois implantados em porcas. O grupo observou uma estrutura normal dos blastocistos, validou a pluripotência da massa celular interna e confirmou a inativação do vírus PERV a 100%. Apesar da baixa eficiência nas gestações, o grupo conseguiu, com sucesso, produzir porcos com o vírus PERV inativado. O grupo confirmou que os leitões apresentavam uma inativação, a nível genómico, do PERV a 100%, e não apresentavam alterações estruturais anormais (Niu *et al.*, 2017).

#### 4.2. Órgãos humanos em animais: Quimeras

Atualmente, uma quimera é referida como um órgão ou tecido composto, pelo menos, por duas populações celulares geneticamente distintas que originam de diferentes zigotos. Mesmo sem falar em quimeras produzidas em laboratório, já estão relatados casos de quimeras naturais. Por exemplo, numa situação de transplante de órgão ou transfusão de sangue, a pessoa recetora torna-se uma quimera parcial; quando dois embriões se fundem no mesmo útero, estamos na presença de um quimerismo sistémico; e, por fim, durante a gravidez ocorre microquimerismo, uma vez que algumas células do feto passam para a corrente sanguínea da mãe (Suchy e Nakauchi, 2017).



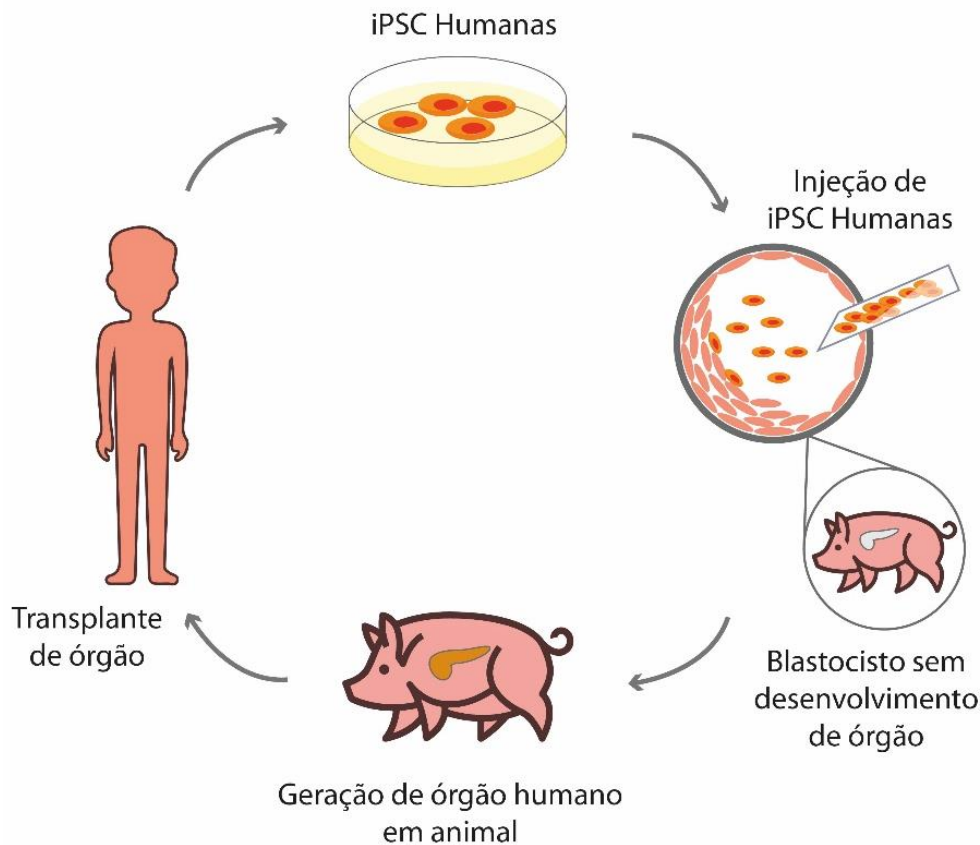
A formação de quimeras, que será explicada nesta secção, tem por base a realização de diversas técnicas de modificação genética durante a fase de desenvolvimento embrionário. Como tal é necessário entender esse desenvolvimento e as células participantes.

Após o momento da fecundação, o zigoto começa a dividir-se, atravessando a fase de segmentação, sem aumentar de tamanho, uma vez que se encontra envolvido pela zona pelúcida. Quando o zigoto se encontra na forma de 16 células, torna-se uma morula. De seguida, as células mais externas da morula começam a compactar, formando o trofoblasto, enquanto as células mais internas começam a recolher-se para uma zona, criando o embrioblasto. Nesta fase está formado o blastocisto composto trofoblasto, embrioblasto (ou massa celular interna) e o blastocélio (cavidade do blastocisto). De seguida, o blastocisto separa-se da zona pelúcida e torna-se livre para se ligar à superfície mucosa da cavidade uterina (Embryology, 2006a).

A massa celular interna (IMC) é composta por células estaminais embrionárias (ESC), que são células pluripotentes, ou seja, células com a capacidade/potencial de diferenciar em todo o tipo de células menos células extraembrionárias, como a placenta. Ao fim da segunda semana de fecundação, a massa celular interna diferencia-se em duas camadas germinativas, a ectoderme e a endoderme. Com a continuação da diferenciação, chegamos à fase da gastrulação, onde ocorre a formação do disco embrionário, que contém a linha primitiva. Ao início da terceira semana, as células da ectoderme migram através da linha primitiva e formam a mesoderme, entre as duas anteriores camadas germinativas. Assim sendo, são estas três camadas (ectoderme, mesoderme e endoderme) que vão formar o embrião, e que se vão diferenciar nos diferentes órgãos (Embryology, 2006b).

#### 4.2.1. Métodos para geração de quimeras

O principal objetivo para a criação de quimeras é a produção de animais que apresentem, na sua constituição, um ou mais órgãos geneticamente humanos. Isto possibilitaria a produção de centenas de órgãos se pensarmos no porco, como sendo o animal dador. Esta produção tem por base a técnica de complementação de blastocisto, primeiramente descrita por Chen (Chen *et al.*, 1993). Basicamente, no período de desenvolvimento embrionário do animal recetor, é retirado um gene essencial para desenvolvimento de um determinado órgão, o que leva à formação de um nicho onde o órgão se deveria desenvolver. Esse nicho é depois preenchido, através de uma injeção de células pluripotentes da espécie dadora de interesse, levando à formação de um órgão geneticamente idêntico ao do animal dador, mas produzido pelo animal recetor (Chen *et al.*, 1993; Nagashima e Matsunari, 2016; Suchy e Nakauchi, 2017). Ou seja, iríamos produzir um órgão humano no corpo de um porco (ver Figura 5).



**Figura 5:** Ciclo de geração de órgãos humanos *in vivo* usando a complementação de blastocisto. Células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC) humanas são derivadas do doente que necessita do órgão. Essas iPSC são injetadas num blastocisto de um animal que foi geneticamente modificado para prevenir o desenvolvimento do órgão necessário pelo paciente. As iPSC complementam o nicho vazio do blastocisto, produzindo um órgão constituído pelas células do doente. (Adaptado de: Suchy e Nakauchi, 2017)

Apesar do objetivo parecer simples, a sua execução não o é. Como dito anteriormente, existem 2 passos críticos para a produção de quimeras: a escolha da técnica adequada à remoção do gene pretendido e a escolha das células pluripotentes que permitam a criação da quimera.

A formação do nicho implica a remoção de genes essenciais para o desenvolvimento de certos órgãos, levando à formação de um “espaço vazio” que pode depois ser “preenchido” por células dadoras. Essa remoção é feita através de *KOs* genéticos que podem ser realizados por diversos tipos de ferramentas genéticas como as *Zinc-Finger* e as TALEN e, mais recentemente, a CRISPR-Cas9 (Suchy e Nakauchi, 2017). As *Zinc-Finger* e as TALEN começaram por ser utilizadas para criar murganhos e ratos transgênicos que não possuíam esses genes, e onde foi possível desenvolver a técnica de complementação de blastocistos (Feng *et al.*, 2015; Nagashima e Matsunari, 2016). Com o desenvolvimento da tecnologia, a CRISPR-Cas9 tornou-se mais segura e menos sujeita a erro. A CRISPR-Cas9 foi utilizada, pela

primeira vez, para a realização de KO genético pelo grupo de Rudolph Jaenisch, já anteriormente o primeiro a desenvolver o murganho transgênico (Yang, Wang e Jaenisch, 2014). Este grupo criou um RNA guia acoplado ao sistema CRISPR-Cas9 para reconhecer o gene *Pdx1*, responsável pelo desenvolvimento pancreático nos murganhos. Neste estudo conseguiram uma eficácia de 80% na produção de zigotos de murganho sem a presença do gene e, conseqüentemente, sem desenvolvimento pancreático. Esta técnica foi depois aplicada a outros genes e animais, que serão referidos mais à frente.

No entanto, o processo só pode ser completo quando se preencher esse espaço proporcionado pela ação da CRISPR-Cas9. Para tal, é necessário introduzir células pluripotentes, como as células estaminais, que se encontrem no mesmo estado evolutivo e temporal das células presentes no blastocisto recetor (Suchy e Nakauchi, 2017; Wu *et al.*, 2017). Diversos estudos têm demonstrado que ESC de murganho no seu estado *naive* contribuem melhor para a formação de quimeras interespécie comparativamente com as células estaminais epiblasticas em estado *primed*. Isto demonstra que quanto mais “novas” forem as células estaminais, maior é a sua pluripotência e mais fácil é a produção de quimeras. Comparativamente a estas, as células estaminais pluripotentes humanas aproximam-se, temporalmente, às células estaminais epiblasticas de murganho em estado *primed*. Podemos concluir que, tal como as ESC de murganho em estado *naive*, as células estaminais pluripotentes humanas que se encontrem em estado *naive* podem ser usadas para criar chimeras interespécie (Wu *et al.*, 2017; Wu e Belmonte, 2016).

#### 4.2.2. Situação Atual

Em 2010, Kobayashi e o seu grupo (Kobayashi *et al.*, 2010) decidiram criar as primeiras quimeras, utilizando as técnicas referidas anteriormente. O grupo utilizou blastocistos obtidos através de murganhos KO homozigóticos do gene *Pdx1-LacZ*, ou seja, murganhos que não desenvolveram pâncreas. Estes murganhos sobrevivem até 1 semana após o nascimento, morrendo nesta altura devido a insuficiência pancreática. Estes blastocistos foram depois injetados por iPSCs de rato e 139 embriões foram transferidos para o útero de murganhos, dos quais nasceram 34, que sobreviveram até ao estado adulto. Destes 34 murganhos, descobriu-se que a manifestação genética do *Pdx1* era mista, ou seja, alguns eram heterozigóticos (*Pdx1*<sup>+/-</sup>) e outros eram homozigóticos (*Pdx1*<sup>-/-</sup>). Através de marcação EGFP, conseguiu-se concluir que o pâncreas presente nos murganhos *Pdx1*<sup>-/-</sup> era totalmente composto por células derivados de iPSCs de rato, enquanto que nos murganhos *Pdx1*<sup>+/-</sup> essa contribuição era mínima comparativamente às células derivadas do hospedeiro (Kobayashi *et al.*, 2010). Através de diversos outros testes de marcação, o grupo conseguiu confirmar que o

pâncreas se desenvolveu inteiramente a partir das células iPSC dadoras de rato e, com este desenvolvimento, os murganhos conseguiram atingir a idade adulta oito semanas após nascimento e sem sinais de insuficiência pancreática. Este estudo veio demonstrar a viabilidade na criação de quimeras e abriu o caminho para o desenvolvimento de outros protocolos que permitam a produção de quimeras contendo órgãos humanos (Kobayashi *et al.*, 2010).

Mais recentemente, um grupo do *Salk Institute* desenvolveu um protocolo para criar porcos *KO* do gene *Pdx1* utilizando a CRISPR-Cas9. O grupo queria investigar se usando a CRISPR-Cas9, conseguiam criar porcos que demonstrassem falha no desenvolvimento do pâncreas (Wu *et al.*, 2017). Para tal, começaram por criar um sgRNA que tivesse como alvo o exão I do gene *Pdx1*. Depois injetaram este sgRNA em embriões de porco, *in vitro*, e analisaram o seu DNA, através da sequenciação de *Sanger*, após atingirem a fase de blastocisto. Com esta análise o grupo concluiu que a ação do sgRNA tinha sido pouco eficaz. Com estes dados, o grupo decidiu utilizar dois sgRNA para aumentar o grau de edição genética. Com esta alteração, conseguiram obter mais blastocistos que apresentavam a mutação (Wu *et al.*, 2017). De seguida, quiseram saber se a CRISPR-Cas9 conseguia mutar o gene de forma a inibir o desenvolvimento pancreático. Para tal, transferiram um conjunto de 18 blastocistos, posteriormente alterados pelo duplo sgRNA/Cas9, no útero de um porco. Ao fim 28 dias de gestação, a gravidez foi interrompida e foram retirados 9 embriões com tamanho e morfologia normal. Três dos nove embriões apresentavam mutação no gene *Pdx1* e falta de desenvolvimento pancreático (Wu *et al.*, 2017).

#### 4.2.3. Problemas associados

Um dos problemas associados com a produção de quimeras é a distância evolucionária entre o dador e o hospedeiro. Existem barreiras xenogénicas que impedem o desenvolvimento das quimeras interespécies e que podem ocorrer devido a erros entre recetores de superfície, incompatibilidade nas citocinas, entre outros. Esta barreira é proporcional à distância evolucionária entre duas espécies e isto é evidente se tivermos em atenção a distância entre as espécies. Os ratos e os murganhos divergiram há 25 milhões de anos, enquanto os humanos e os porcos já divergiram há 94 milhões de anos, o que pode constituir uma dificuldade acrescida na produção de quimeras (Los Angeles, De, Pho e Redmond, 2018; Masaki e Nakauchi, 2017; Rashid, Kobayashi e Nakauchi, 2014; Suchy e Nakauchi, 2017).

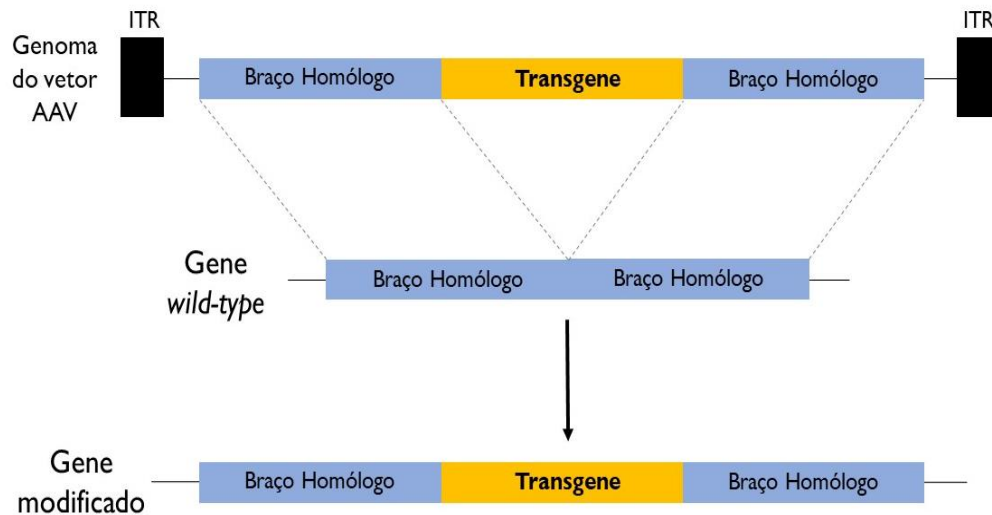
Para além disto, outro grande obstáculo à produção de quimeras humano-animal é o risco de transferência de material humano para outros tecidos que não sejam os tecidos-alvo, como por exemplo o cérebro. Isto leva ao aparecimento de 3 principais problemas éticos, que são: ocorrência de suficientes modificações cerebrais que originam o desenvolvimento de

“consciência” humana ou de capacidades cognitivas semelhantes às humanas; desenvolvimento de gametas humanos ou suficientemente semelhantes que podem originar fecundação humano-animal; e ocorrência de modificações genéticas que levem ao aparecimento de fenótipos humanos em animais, como sendo cara, olhos membros e, também, a capacidade de fala (Bourret *et al.*, 2016; Rashid, Kobayashi e Nakauchi, 2014).

## **5. Resolução da compatibilidade/rejeição dos órgãos: Órgãos Dadores Universais**

Apesar do desenvolvimento biotecnológico referido nas secções anteriores, é evidente que o risco de rejeição dos órgãos transplantados permanece um problema. Como dito anteriormente, a presença dos antígenos HLA autólogos presentes nos órgãos transplantados, podem levar à rejeição hiperaguda do órgão, com consequente perda de função deste. Têm, no entanto, vindo a ser desenvolvidos estudos no sentido de encontrar uma solução para este problema.

O grupo designado de *Universal Cells* tem como objetivo principal, criar órgãos e tecidos capazes de “evitar” a resposta imunológica do hospedeiro. Este grupo utiliza vírus adeno-associados recombinantes (rAAV) para editar geneticamente células pluripotentes humanas, de forma a não apresentarem antígenos HLA classe I e classe II hipervariáveis, tornando-se irreconhecíveis ao organismo como “corpos estranhos” (Research Features, 2016). Os vírus adeno-associados são vírus com DNA de cadeia simples (ssDNA), sem envelope, que apenas se conseguem replicar com um vírus auxiliar, como os adenovírus, ou os respectivos genes. O seu genoma viral de ~4,7kb apresenta 2 genes: *rep* e *cap*. O gene *rep* está responsável pela replicação, integração e regulação transcripcional viral. Já o gene *cap* é essencial para a produção da cápside viral. Em cada extremidade do genoma estão presentes repetições terminais invertidas (ITR) com formato de gancho do cabelo (*hairpin*) em forma de T (Gaj, Epstein e Schaffer, 2016). A transmissão do vírus começa com a ligação deste a recetores de superfície específicos, como por exemplo proteoglicanos de sulfato de heparina, bem como a um recetor secundário que medeia a internalização endocítica. Ao entrar no núcleo, o ssDNA viral de cadeia simples é transformado em DNA de dupla cadeia (dsDNA) através da polimerase de DNA do hospedeiro. A integração deste DNA viral é depois mediada pelas proteínas *rep* que reconhecem locais específicos de ligação (Gaj, Epstein e Schaffer, 2016).



**Figura 6:** Síntese do direcionamento genético mediado pelo AAV. Os vetores AAV que contém sequências de DNA homólogas a um específico local, podem ser recombinadas com esse locus genômico. Ao modificar a sequência de DNA existente entre os braços homólogos, é possível introduzir modificações no genoma do hospedeiro. (Adaptado de Gaj, Epstein e Schaffer, 2016)

Foi através de estudos realizados sobre esta integração que se verificou que o genoma viral dos AAV têm a capacidade de estimular a recombinação homóloga, ou seja, a inserção de um transgene cujas extremidades são idênticas àquelas presentes no gene específico que queremos modificar (ver Figura 6). Isto permite a edição genética de uma única base ou a integração de um gene completo num local específico do DNA (Gaj, Epstein e Schaffer, 2016). O grupo começou por direcionar a sua investigação para a eliminação do gene codificante da Beta-2 Microglobulina (B2M). Este gene não é polimórfico e codifica uma subunidade proteica comum necessária para a expressão da cadeia pesada de todas as HLA classe I. Ao criar PSC humanas  $B2M^{-/-}$ , as HLA classe I são eliminadas da superfície celular e, assim, não é estimulada a resposta imunológica alogénica, mediada pelas células  $CD8^{+}$  (T cells). No entanto, foi demonstrado que a ausência de HLA classe I à superfície das células, levava à lise celular através de células NK (natural killer) devido à falta de resposta *self* (Gornalusse *et al.*, 2017). Existe, no entanto, uma forma de evitar esta lise celular, através da interação das células NK com as proteínas HLA-E polimórficas. Estas proteínas formam heterodímeros com a subunidade B2M, fazendo com que esta não esteja expressa à superfície das células. Este tornou-se, então, o objetivo do grupo: criar células B2M negativas, de forma a impedir a resposta imunológica mediada pelas células T, mas que apresentassem proteínas HLA-E à superfície das células, de forma a evitar a lise celular mediada pelas células NK (Gornalusse *et al.*, 2017).

Para tal, utilizaram vetores rAAV capazes de introduzir, no loci do B2M, o gene responsável pela produção das proteínas HLA-E. Para tal foram criados quatro vetores: o

vetor AAV-B2M-HyTK responsável pelo silenciamento do gene B2M num dos alelos; os vetores AAV-B2M-Edimer e AAV-B2M-Etrimer para introduzir o gene responsável pelas proteínas HLA-E dímero e HLA-E trímero, respetivamente, no segundo alelo; e o vetor AAV-B2M-TKN para silenciar o gene B2M desse mesmo alelo. Isto levou à criação de 3 linhas celulares ( $B2M^{-/Edimer}$ ,  $B2M^{-/Etrimer}$  e  $B2M^{-/-}$ ) que foram estudadas para verificar a presença ou ausência de moléculas HLA classe I (Gornalusse *et al.*, 2017).

Estas linhas celulares foram colocadas em meio contendo IFN- $\gamma$ . Esta citocina levou a um aumento da expressão das moléculas HLA classe I e B2M nas células, o que permite estudar a sua presença na superfície das células. Os dados recolhidos após a colocação no meio demonstram a ausência de moléculas HLA classe I (HLA-A e HLA-BC) e a presença de moléculas HLA-E à superfície das células. De seguida, utilizaram modelos *in vitro* e *in vivo* destas linhas celulares para determinar se existia resposta imunológica em resposta às células  $B2M^{-/Edimer}$  e  $B2M^{-/Etrimer}$ , introduzindo estas células em meios contendo células T CD8+. Os dados recolhidos demonstraram que as células T CD8+ lisaram eficientemente as células  $B2M^{+/+}$  mas não conseguiram lisar as células  $B2M^{-/Edimer}$  e  $B2M^{-/Etrimer}$ . Estes resultados demonstram que foi possível criar células pluripotentes humanas que não estimulam a resposta imunológica alogénica mediada por células T CD8+, nem estimulam a lise celular mediada pelas células NK, tornando-se assim, as primeiras células dadoras universais (Gornalusse *et al.*, 2017).

## 6. Problemas Bioéticos

As técnicas de clonagem, como a CRISPR, bem como o uso de animais para investigação médico-científica estão associadas a questões bioéticas e morais. Será então de esperar que, com o desenvolvimento de técnicas que permitem a criação de órgãos, humanos ou animais, para o transplante de órgãos, estas questões éticas estejam ainda mais presentes e sejam ainda mais restritivas. As principais questões éticas, associadas à utilização de processos biotecnológicos para a criação de órgãos para transplante humano, podem ser divididas em três tópicos: a fonte de células estaminais; a utilização do porco, como animal de produção; e os problemas associados à formação de quimeras.

Grande parte das tecnologias referidas anteriormente, utilizam, como material biológico, as células estaminais humanas (ESC e iPSC). A maioria destas células são provenientes do sangue do cordão umbilical ou são retiradas de embriões humanos. Isto levanta a questão: estarão embriões/fetos humanos a ser destruídos em prol do avanço científico? Isto levou a que diversos países criassem leis para regular o uso de células estaminais

na investigação. Nos EUA, está legislado que qualquer investigação científica pode ser realizada utilizando linhas celulares pré-existentes, ou novas linhas celulares (Obama, 2009), desde que: os embriões utilizados não tenham sido criados exclusivamente para o uso em investigação e que não sofram maiores riscos ou pior morte que o permitido em investigação realizada em fetos no útero (United States Congress, 1996). Já na Inglaterra, o uso de células estaminais para investigação científica é permitido e podem ser extraídas células de embriões fertilizados *in vitro*, doados à instituição (Abouna, 2003), mas sempre tendo em atenção as *guidelines* em vigor no país.

O uso de animais em investigação levanta sempre um número de questões éticas. Com o desenvolvimento de técnicas que se espera venham a permitir a criação de órgãos humanos em porco, estas questões tornaram-se mais prementes. O principal debate centra-se na qualidade de vida/razão de existência dos porcos transgênicos versus o risco de cancro, malformações e morte desnecessária desses porcos. Os defensores dos animais defendem que os porcos transgênicos apresentam um elevado risco de aparecimento de cancro e malformações, originadas pelas técnicas de edição genética referidas anteriormente, risco esse que não existiria se fossem criados para alimentação (Casal e Williams, 2019). No entanto, pode argumentar-se que esses mesmos porcos, para alimentação, estão a ser produzidos em piores condições. Os porcos transgênicos são produzidos sob *guidelines* restritivas para evitar o aparecimento de doenças e são criados de forma específica para que os órgãos apresentem a melhor qualidade para transplante (Abouna, 2003). Pode-se, então, argumentar que os porcos transgênicos vivem uma vida melhor, comparativamente aos porcos produzidos em pecuárias para alimentação.

Existem, no entanto, outros problemas éticos associados à produção de quimeras humano-porco. O potencial para ganho de consciência humana, o risco de aparecimento de fenótipos humanos e o desenvolvimento de gametas humanos, levando a fecundação porco-homem são questões éticas muito importantes, referidas também na secção 7.2., que devem ser cuidadosamente analisadas para o desenvolvimento das técnicas de quimerismo. A potencial presença de consciência obrigaria a que o animal fosse tratado como humano, o que levaria à proibição de qualquer produção de órgãos, tornando-se assim, um obstáculo para a investigação científica (Bourret *et al.*, 2016).



## 7. Conclusões

A falta de órgãos disponíveis para doação está a tornar-se um grave problema de saúde pública. Com o aumento de doentes a necessitar de transplante e com a diminuição da quantidade de órgãos disponíveis, milhares de pessoas em lista de espera morrem todos os anos por não conseguirem receber o transplante que tanto precisam.

No entanto, mesmo aqueles que são transplantados, correm diversos riscos para manter esse órgão. A rejeição do órgão por parte do transplantado provoca grandes riscos ao doente, podendo levar à necrose do órgão recebido. Para além disso, com a toma de imunossuppressores, o organismo fica mais suscetível ao aparecimento de infeções, que podem levar à morte do doente transplantado.

As técnicas de clonagem e de bioengenharia desenvolvidas nos últimos anos, abriram a porta a muitas oportunidades de investigação e desenvolvimento científico, revolucionando a forma como estudamos as doenças e como as podemos tratar. A técnica CRISPR, principalmente, permitiu o desenvolvimento da edição genética, que nos possibilitou modificar genes que originam doenças, anteriormente impossíveis de tratar.

É também através destas técnicas, que está a ser possível criar órgãos em laboratório, livres de vírus provenientes de animais domésticos, como o porco; sem moléculas estimuladoras da resposta imune; ou produzidas, quase na totalidade, através de células pluripotentes, provenientes do hospedeiro, reduzindo quase para 0% o risco de rejeição do órgão. O aumento da utilização destas técnicas, poderá vir a permitir realizar transplantes de órgãos em que o uso de imunossuppressores, para evitar rejeição do órgão, será reduzido, ou até mesmo nulo, aumentando assim o conforto e a qualidade de vida do doente.

Apesar das questões éticas, é importante investir e apoiar o desenvolvimento destas tecnologias com células humanas, de forma a se desenvolverem técnicas robustas e seguras, para que seja possível iniciar ensaios clínicos que demonstrem a sua eficácia e eficiência, sendo assim possível vir a dar resposta, o mais depressa possível, à falta crescente de órgãos para transplante.

## 8. Bibliografia

ABOUNA, George M. - **Ethical Issues in Organ Transplantation.** Medical Principles and Practice. 12:1 (2003) 54–69.

ALI, Jason M. *et al.* - **Allorecognition pathways in transplant rejection and tolerance.** Transplantation. 96:8 (2013) 681–688.

BOKSA, Magdalena *et al.* - **Immune Modulation in Xenotransplantation.** Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis. 63:3 (2015) 181–192.

BOURRET, Rodolphe *et al.* - **Human-animal chimeras: Ethical issues about farming chimeric animals bearing human organs.** Stem Cell Research and Therapy. 7:1 (2016) 1–7.

CASAL, Paula; WILLIAMS, Andrew - **Human iPSC-Chimera Xenotransplantation and the Non-Identity Problem.** Journal of Clinical Medicine. 8:1 (2019) 95.

CHEN, Jianzhu *et al.* - **RAG-2-deficient blastocyst complementation: An assay of gene function in lymphocyte development.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:May (1993) 4528–4532.

CITERIO, Giuseppe *et al.* - **Organ donation in adults: a critical care perspective.** Intensive Care Medicine. 42:3 (2016) 305–315.

COMISSÃO EUROPEIA - **Doação e Transplantação de Órgãos, Sangue, Tecidos e Células na União Europeia.** IPST (2019). [Acedido a 9 de junho de 2019] [http://ipst.pt/files/TRANSPLANTACAO/Organs\\_BTC\\_-EU\\_Final\\_PT.PDF](http://ipst.pt/files/TRANSPLANTACAO/Organs_BTC_-EU_Final_PT.PDF)

COOPER, David K. C. *et al.* - **The pathobiology of pig-to-primate xenotransplantation: A historical review.** Xenotransplantation. 23:2 (2016) 83–105.

COOPER, David K. C.; GOLLACKNER, Bernd; SACHS, David H. - **Will the Pig Solve the Transplantation Backlog?** Annual Review of Medicine. 53:1 (2002) 133–147.

COZZI, Emanuele; COLPO, Anna; SILVESTRO, Giustina DE - **The mechanisms of rejection in solid organ transplantation.** Transfusion and Apheresis Science. 56:4 (2017) 498–505.

CRAPO, Peter M.; GILBERT, Thomas W.; BADYLAK, Stephen F. - **An overview of tissue and whole organ decellularization processes.** Biomaterials. 32:12 (2011) 3233–3243.

CUI, Haitao *et al.* - **3D Bioprinting for Organ Regeneration**. *Advanced Healthcare Materials*. 6:1 (2017).

D.C., Hsu; C.H., Katelaris - **Long-term management of patients taking immunosuppressive drugs**. *Australian Prescriber*. 32:3 (2009) 68–71.

DOUDNA, Jennifer A.; CHARPENTIER, Emmanuelle - **The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9**. *Science*. 346:6213 (2014) 1258096–1258096.

EMBRYOLOGY (2006a) - **How a blastocyst is engendered**. (2006). [Acedido a 15 março de 2019]. <http://www.embryology.ch/anglais/evorimplantation/furchung02.html>

EMBRYOLOGY (2006b) - **Review of the development during the 2nd embryonic week** (2006). [Acedido a 15 de março de 2019]. <http://www.embryology.ch/anglais/hdisqueembry/diderm01.html>

FENG, Wanyou *et al.* - **The potential of the combination of CRISPR/Cas9 and pluripotent stem cells to provide human organs from chimaeric pigs**. *International Journal of Molecular Sciences*. 16:3 (2015) 6545–6556.

GAJ, Thomas; EPSTEIN, Benjamin E.; SCHAFFER, David V. - **Genome engineering using Adeno-associated virus: Basic and clinical research applications**. *Molecular Therapy*. 24:3 (2016) 458–464.

GILBERT, Thomas W.; SELLARO, Tiffany L.; BADYLAK, Stephen F. - **Decellularization of tissues and organs**. *Biomaterials*. 27:19 (2006) 3675–3683.

GORNALUSSE, Germán G. *et al.* - **HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells**. *Nature Biotechnology*. 35:8 (2017) 765–772.

GUYETTE, Jacques P. *et al.* - **Perfusion decellularization of whole organs**. *Nature Protocols*. 9:6 (2014) 1451–1468.

HOLT, Curtis D. - **Overview of Immunosuppressive Therapy in Solid Organ Transplantation**. *Anesthesiology Clinics*. 35:3 (2017) 365–380.

HRYHOROWICZ, Magdalena *et al.* - **Genetically Modified Pigs as Organ Donors for Xenotransplantation**. *Molecular Biotechnology*. 59:9–10 (2017) 435–444.

INSTITUTO PORTUGUÊS DO SANGUE E DA TRANSPLANTAÇÃO (IPST) - **Colheita e Transplantação de Órgãos - Resumo da atividade do 1º trimestre de 2019**. IPST

(2019). [ Acedido a 9 de junho de 2019 ]. [http://ipst.pt/files/TRANSPLANTACAO/DOACAOETRANSPLANTACAO/Colheita\\_e\\_Transplantaos\\_IT\\_2019\\_2.pdf](http://ipst.pt/files/TRANSPLANTACAO/DOACAOETRANSPLANTACAO/Colheita_e_Transplantaos_IT_2019_2.pdf)

JIANG, Fuguo; DOUDNA, Jennifer A. - **CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms**. Annual Review of Biophysics. 46:1 (2017) 505–529.

KO, Henry C. H.; MILTHORPE, Bruce K.; MCFARLAND, Clive D. - **Engineering thick tissues - The vascularisation problem**. European Cells and Materials. 14 (2007) 1–18.

KOBAYASHI, Toshihiro *et al.* - **Generation of Rat Pancreas in Mouse by Interspecific Blastocyst Injection of Pluripotent Stem Cells**. Cell. 142:5 (2010) 787–799.

LIN, Christine M.; GILL, Ronald G. - **Direct and indirect allograft recognition**. Current Opinion in Organ Transplantation. 21:1 (2016) 40–44.

LOO, Ellen S. VAN *et al.* - **Outcome of pancreas transplantation from donation after circulatory death compared to donation after brain death**. Pancreatology. 17:1 (2017) 13–18.

ŁOPATA, Krzysztof *et al.* - **Porcine Endogenous Retrovirus (PERV) – Molecular Structure and Replication Strategy in the Context of Retroviral Infection Risk of Human Cells**. Frontiers in Microbiology. 9:APR (2018) 1–11.

LOS ANGELES, Alejandro DE; PHO, Nam; REDMOND, D. Eugene - **Generating human organs via interspecies chimera formation: Advances and barriers**. Yale Journal of Biology and Medicine. 91:3 (2018) 333–342.

MANDRYCKY, Christian *et al.* - **3D bioprinting for engineering complex tissues**. Biotechnology Advances. 34:4 (2016) 422–434.

MASAKI, Hideki; NAKAUCHI, Hiromitsu - **Interspecies chimeras for human stem cell research**. Development. 144:14 (2017) 2544–2547.

MEIER, Raphael P. H. *et al.* - **Xenotransplantation: back to the future?** Transplant International. 31:5 (2018) 465–477.

MOREAU, Aurélie *et al.* - **Effector mechanisms of rejection**. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 3:11 (2013).

MORRISSEY, Paul E.; MONACO, Anthony P. - **Donation after circulatory death: Current practices, ongoing challenges, and potential improvements**. Transplantation. 97:3 (2014) 258–264.

MURPHY, Sean V.; ATALA, Anthony - **3D bioprinting of tissues and organs**. *Nature Biotechnology*. 32:8 (2014) 773–785.

NAGASHIMA, Hiroshi; MATSUNARI, Hitomi - **Growing human organs in pigs-A dream or reality?** *Theriogenology*. 86:1 (2016) 422–426.

NHS BLOOD AND TRANSPLANT - **Donation after brainstem death**. NHS Blood and Transplant (2019). [Acedido a 26 de maio de 2019]. [https://nhsbt.dbe.blob.core.windows.net/umbraco-assets-corp/3654/dbd\\_care\\_bundle.pdf](https://nhsbt.dbe.blob.core.windows.net/umbraco-assets-corp/3654/dbd_care_bundle.pdf)

NIU, Dong *et al.* - **Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9**. *Science*. 357:6357 (2017) 1303–1307.

OBAMA, Barack - **Executive Order: Removing Barriers to Responsible Scientific Research Involving Human Stem Cells**. The White House. [Acedido a 2 de junho de 2019]. <https://www.presidency.ucsb.edu/documents/executive-order-13505-removing-barriers-responsible-scientific-research-involving-human>

OTT, Harald C. *et al.* - **Perfusion-decellularized matrix: Using nature's platform to engineer a bioartificial heart**. *Nature Medicine*. 14:2 (2008) 213–221.

PHELPS, C. J. - **Production of alpha 1,3-Galactosyltransferase-Deficient Pigs**. *Science*. 299:5605 (2003) 411–414.

RASHID, Tamir; KOBAYASHI, Toshihiro; NAKAUCHI, Hiromitsu - **Revisiting the flight of icarus: Making human organs from PSCs with large animal chimeras**. *Cell Stem Cell*. 15:4 (2014) 406–409.

RESEARCH FEATURES (article) - **Universal donor cells – a revolution against rejection**. *Health & Medicine*, Issue 102 (2016). [Acedido em 20 de maio de 2019] <https://researchfeatures.com/2016/11/22/universal-donor-cells-revolution-against-rejection/>

SCARRIT, Michelle E. - **A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs**. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 3:March (2015) 1–17.

SNELL, Gregory I. *et al.* - **Donation after Brain Death versus Donation after Circulatory Death: Lung Donor Management Issues**. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 39:2 (2018) 138–147.

STEVENS, Sean - **Synthetic Biology in Cell and Organ Transplantation**. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 9:2 (2017) a029561.

- SUCHY, Fabian; NAKAUCHI, Hiromitsu - **Lessons from Interspecies Mammalian Chimeras**. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 33:1 (2017) 203–217.
- SUYLEN, V. VAN *et al.* - **A Multicenter Study on Long-Term Outcomes After Lung Transplantation Comparing Donation After Circulatory Death and Donation After Brain Death**. *American Journal of Transplantation*. 17:10 (2017) 2679–2686.
- UNITED NETWORK FOR ORGAN SHARING (UNOS) - **Living Donation**. UNOS (2019). [Acedido em 9 de junho de 2019]. <https://unos.org/transplant/living-donation/>
- UNITED STATES CONGRESS - **Public Law 104-99**. H.R. 2880, The Library of Congress (1996). [Acedido a 2 de junho de 2019]. <https://www.congress.gov/bill/104th-congress/house-bill/02880>
- VADORI, M.; COZZI, E. - **The immunological barriers to xenotransplantation**. *Tissue Antigens*. 86:4 (2015) 239–253.
- WANG, Yujia *et al.* - **Recent Advances in Decellularization and Recellularization for Tissue-Engineered Liver Grafts**. *Cells Tissues Organs*. 203:4 (2017) 203–214.
- WELMAN, Ted *et al.* - **Bioengineering for Organ Transplantation: Progress and Challenges**. *Bioengineered*. 6:5 (2015) 257–261.
- WHEELER, Debra G. *et al.* - **Transgenic swine: Expression of human CD39 protects against myocardial injury**. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 52:5 (2012) 958–961.
- WILSON, Matthew H.; COATES, Craig J.; GEORGE, Alfred L. - **PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells**. *Molecular Therapy*. 15:1 (2007) 139–145.
- WISEMAN, Alexander C. - **Immunosuppressive Medications**. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 11:2 (2016) 332–343.
- WU, Jun *et al.* - **CRISPR-Cas9 mediated one-step disabling of pancreatogenesis in pigs**. *Scientific Reports*. 7:1 (2017) 1–6.
- WU, Jun *et al.* - **Interspecies Chimerism with Mammalian Pluripotent Stem Cells**. *Cell*. 168:3 (2017) 473-486.e15.
- WU, Jun; BELMONTE, Juan Carlos Izpisua - **Interspecies chimeric complementation for the generation of functional human tissues and organs in large animal hosts**. *Transgenic Research*. 25:3 (2016) 375–384.

YANG, Hui; WANG, Haoyi; JAENISCH, Rudolf - **Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering.** Nature Protocols. 9:8 (2014) 1956–1968.

YANG, L. *et al.* - **Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs).** Science. 350:6264 (2015) 1101–1104.

## 9. Anexo

Anexo I – Tabela comparativa das diferentes técnicas de bio-impressão 3D

Técnicas de Bio-impressão						
Tipo	Base	Processo	Mecanismo	Vantagens	Desvantagens	Referências
Bio-impressão baseada em Extrução	Bio-impressão baseada em Extrução	Fused deposition modeling (FDM)	Utiliza filamentos aquecidos até ao seu ponto de fusão ou estado de semifusão, que são passados por furos de extrusão, sendo deixados a solidificar no prato de impressão	Baixo custo, relativamente rápido	Pouca escolha de biomateriais, não pode ser utilizado com células	Cui et al., 2017
	Bio-impressão baseada em Laser	Selective laser sintering (SLS)	Utiliza um laser de elevado poder que atinge e aquece uma camada de pó sinterizado, formando sólidas estruturas 3D	Rápida impressão, grande variedade de biomateriais possíveis,	Mais caro, baixa resolução, impressões rígidas, degradação termal	
Bio-impressão baseada em Gotículas	Bio-impressão baseada em Gotículas	Inkjet	A "tinta", que contém biomateriais, fatores bioativos e células, está armazenada num reservatório que é depois transferido para um compartimento que inicia a ejeção por gotículas	Facilmente disponível, relativamente barata, fabrico rápido, altamente replicável, elevada resolução de impressão	Apenas aceita soluções com baixa viscosidade e baixa concentração celular	Cui et al., 2017; Mandrycky et al., 2016; Murphy e Atala, 2014
		Electrohydrodynamic jetting	Aplica uma diferença de potencial entre uma agulha carregada positivamente e um eléctrodo "grounded" para gerar uma força Coulombica repulsiva	Tamanho e distribuição das gotículas pode ser controlada, soluções de elevada concentração	-	
	Pneumatic pressure assisting	As gotículas são formadas em micro-válvulas eletromecânicas que se abrem sob constante pressão pneumática	Diferentes tipos de biomateriais, controlo do volume das gotículas	Baixo valor de viscosidade tolerável, dificuldade em gerar estruturas 3D viáveis		
	Pneumatic	Utiliza ar pressurizado para realizar a extrusão de filamentos usando uma configuração com ou sem válvula	Rápida impressão, fácil de operar, elevada deposição, maior tolerância para formulações heterogêneas	Baixa resolução, elevadas tensões de cisalhamento, seleção limitada de biomateriais		
	Mechanical	Método semelhante ao anterior, mas onde a força é realizada de forma mecânica. Podem ser usados sistemas de pistões ou tipo parafuso	Possível atingir elevadas resoluções	Podem produzir estruturas 3D desmveladas, apenas possível com soluções fotocuráveis		
Bio-impressão baseada em Extrução	Bio-impressão baseada em Extrução	Solenoid	Aplica um pulso eléctrico que abre a válvula para passagem da "tinta", através do cancelamento da força magnética gerada entre dois objetos ferro-magnéticos			
Bio-impressão baseada em Esterolitografia	Bio-impressão baseada em Esterolitografia	Beam scanning	Utiliza um feixe laser que ativa uma biotinta fotocurável que se solidifica numa camada 2D paternizada			
		Mask image project	Gera uma imagem que é projetada na superfície da biotinta fotocurável, utilizando uma luz digital que solidifica uma camada inteira 2D, simultaneamente	Método mais rápido, produz estruturas 3D niveladas	Apenas possível com soluções fotocuráveis	