



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Sara Filipa Machado Nobre

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Terapia Molecular na Infecção por HIV – Tendências e Desafios” referentes à Unidade Curricular “Estágio Curricular”, sob a orientação da Dra. Karina Custódio, da Dra. Cátia Augusto e do Professor Doutor Sérgio Simões apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2021



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Sara Filipa Machado Nobre

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada "Terapia Molecular na Infecção por HIV – Tendências e Desafios" referentes à Unidade Curricular "Estágio Curricular", sob a orientação da Dra. Karina Custódio, da Dra. Cátia Augusto e do Professor Doutor Sérgio Simões apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2021

Eu, Sara Filipa Machado Nobre, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2016230415, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Terapia Molecular na Infecção por HIV – Tendências e Desafios” 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, 9 de setembro de 2021.

Sara Filipa Machado Nobre

(Sara Filipa Machado Nobre)

## **AGRADECIMENTOS**

São as pessoas que fazem parte da nossa vida que moldam a nossa maneira de ser e nos fazem querer continuar a crescer e a sonhar. Esta é só mais uma das minhas conquistas que não seria possível sem:

*Os melhores amigos da vida, os meus pais,*  
que incondicionalmente me apoiam e aos quais estarei eternamente grata;

*O meu irmão,*  
que onde quer que esteja está sempre disponível para me dar a mão;

*Os meus amigos e o Gabriel,*  
que me acompanham e que partilham comigo as melhores memórias;

*A minha família de praxe,*  
que me acolheu na FFUC e me mostrou Coimbra como nunca a tinha visto;

*A equipa da Farmácia Cruz,*  
que tanto me ensinou e que hoje é para mim um ninho de amizade;

*A equipa do Departamento de I&D dos Laboratórios Basi,*  
que contribuíram para o meu crescimento tanto a nível profissional como humano;

*O Professor Doutor Sérgio Simões,*  
que me orientou e que tanto contribuiu para o meu gosto pela Terapia Molecular;

*A FFUC e todo o pessoal docente e não docente,*  
que ao longo de cinco anos foram a casa e a família que escolhi.

Obrigada!

*“Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive.”*

**Ricardo Reis**

## ÍNDICE

RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
<b>PARTE I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária</b>	
INTRODUÇÃO .....	11
1. FARMÁCIA CRUZ.....	11
2. ANÁLISE SWOT .....	12
2.1 Pontos Fortes .....	12
2.2 Pontos Fracos .....	13
2.3 Oportunidades .....	13
2.4 Ameaças .....	16
3. CASOS PRÁTICOS .....	17
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	20
ANEXOS .....	21
<b>PARTE 2 – Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica</b>	
INTRODUÇÃO .....	25
1. LABORATÓRIOS BASI – DEPARTAMENTO DE I&D .....	25
2. ANÁLISE SWOT .....	26
2.1 Pontos Fortes .....	26
2.2 Pontos Fracos .....	27
2.3 Oportunidades .....	27
2.4 Ameaças .....	30
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	31
BIBLIOGRAFIA .....	32
<b>PARTE 3 – Monografia</b>	
RESUMO .....	36
ABSTRACT .....	37
INTRODUÇÃO .....	37
1. VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA .....	39
1.1 Classificação .....	39
1.2 Morfologia .....	39
1.3 Genoma.....	39
1.4 Replicação Viral .....	40
1.5 Transmissão .....	41
2. HIV NO MUNDO .....	41

2.1 Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/SIDA (UNAIDS).....	42
2.2 HIV e a pandemia COVID-19 .....	44
3. TERAPÊUTICA.....	45
3.1 Terapêutica Antirretroviral.....	45
3.1.1 Regimes de Profilaxia Pré-Exposição .....	48
3.1.2 Regimes de Profilaxia Pós-Exposição.....	48
3.2 <i>Shock and Kill</i> .....	48
3.3 <i>Block and Lock</i> .....	49
3.4 Terapia Molecular.....	50
3.4.1 Terapia Génica Pré-Transcrição .....	50
3.4.1.1 Transplante de células estaminais hematopoiéticas com mutação CCR5 $\Delta$ 32 ..	50
3.4.1.2 Nucleases.....	51
3.4.1.2.1 Dificuldades de implementação das nucleases.....	55
3.4.2 Terapia Génica Pós-Transcrição.....	55
3.4.2.1 Ribozimas.....	55
3.4.2.2 RNA interference .....	56
3.4.3 Imunoterapia.....	58
3.4.3.1 Vacinas.....	58
3.4.3.2 Transferência passiva de anticorpos.....	59
3.4.3.3 Transferência indireta de anticorpos.....	60
3.4.3.4 Anticorpos monoclonais .....	60
3.4.3.5 Células T CAR.....	61
3.5 Combinação de terapias.....	62
3.6 Barreiras na implementação das novas terapias nos países em desenvolvimento .....	63
CONCLUSÃO .....	65
BIBLIOGRAFIA .....	66

## RESUMO

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) termina com a unidade curricular “Estágio Curricular”. Esta unidade curricular ocupa o segundo semestre do quinto ano, uma vez que visa a concretização de um ou dois estágios e de uma monografia. Deste modo, como optei pela realização de dois estágios curriculares, o presente documento inclui três partes: (1) relatório de estágio em farmácia comunitária; (2) relatório de estágio em indústria farmacêutica e (3) monografia.

Primeiramente, é apresentado o relatório do estágio que realizei na Farmácia Cruz, em Cantanhede, sob orientação da Dra. Karina Custódio e com duração de 4 meses. Em seguida, a segunda parte é relativa ao estágio que realizei no departamento de Investigação e Desenvolvimento (I&D) dos Laboratórios Basi, em Mortágua, sob orientação da Dra. Cátia Augusto e com duração de 3 meses. Ambos os relatórios assumem a forma de uma análise SWOT (*Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*).

Por último, é apresentada a monografia intitulada “Terapia Molecular na Infeção por HIV – Tendências e Desafios”, realizada sob orientação do Professor Doutor Sérgio Simões. Após contextualização do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e análise da evolução da epidemia de HIV/SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) até à atualidade, é realizada uma revisão da terapêutica anti-HIV existente e das estratégias terapêuticas em estudo e é feita uma análise crítica dos desafios à sua implementação nos países pouco desenvolvidos.



## **ABSTRACT**

The Integrated Master's in Pharmaceutical Sciences (MICF) at the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra (FFUC) ends with the curricular unit "Curricular Internship". This curricular unit takes place during the second semester of the fifth year, as it entails completing one or two internships and a monograph. Thus, as two curricular internships were carried out, this document includes three parts: (1) community pharmacy internship report; (2) pharmaceutical industry internship report and (3) monograph.

First, the report concerning the internship at Farmácia Cruz, in Cantanhede, under the guidance of Ms. Karina Custódio and with a duration of 4 months, is presented. The document continues with the report on the internship carried out in the Research and Development (R&D) department of Laboratórios Basi, in Mortágua, under the supervision of Ms. Cátia Augusto and lasting 3 months. Both reports take the form of a SWOT analysis (Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats).

This thesis ends with the monograph entitled "Molecular Therapy in HIV Infection – Trends and Challenges", carried out under the supervision of Professor Sérgio Simões. After contextualizing the Human Immunodeficiency Virus (HIV) and analyzing the evolution of the HIV/AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) epidemic to date, the thesis presents a review of the existing anti-HIV therapy and the therapeutic strategies under research and a critical analysis of the challenges for their implementation in developing countries.

# **PARTE I**

## **Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária**

**FARMÁCIA CRUZ**

**Cantanhede**

Sob orientação da Dra. Karina Custódio.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ANF</b>	Associação Nacional de Farmácias
<b>FFUC</b>	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
<b>MICF</b>	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
<b>MNSRM</b>	Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica
<b>MSRM</b>	Medicamentos Sujeitos a Receita Médica
<b>PDCA</b>	<i>Plan, Do, Check, Act</i>
<b>RCM</b>	Resumo das Características do Medicamento
<b>SARS-CoV-2</b>	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
<b>SNS</b>	Serviço Nacional de Saúde
<b>SWOT</b>	<i>Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats</i>

## INTRODUÇÃO

O plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) inclui a realização obrigatória de um estágio em Farmácia Comunitária. Assim, como estudante deste curso, tive o privilégio de realizar este estágio na Farmácia Cruz, em Cantanhede, com início no dia 12 de abril de 2021 e término no dia 6 de agosto de 2021, sob orientação da Dra. Karina Custódio.

O presente relatório de estágio em Farmácia Comunitária assume a forma de uma análise SWOT, onde são evidenciados os fatores internos - pontos fortes (*Strengths*) e pontos fracos (*Weaknesses*) que me caracterizavam no início do estágio e que foram relevantes para o meu desempenho enquanto estagiária - bem como os fatores externos - oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*) que o estágio revelou. São ainda relatados três casos práticos reais com que me deparei durante o estágio na Farmácia Cruz.

### I. FARMÁCIA CRUZ

A Farmácia Cruz Unipessoal Lda. inclui, atualmente, a Farmácia Cruz, onde realizei o estágio, localizada no Largo D. João Crisóstomo, Cantanhede, e a Farmácia S. Damião situada em Cordinhã, uma aldeia vizinha no concelho. A Farmácia Cruz está ainda integrada num grupo de farmácias (Farmácia Recardães, Farmácia Loureiro, Farmácia do Bairro, Farmácia Alagoas, Farmácia Soure e Farmácia Lima-da-Silva) que, em conjunto, trabalham para um objetivo comum: a satisfação do utente.

Localizada numa cidade de pequena dimensão, a Farmácia Cruz serve uma população de várias classes sociais, desde jovens a idosos, onde a fidelização do utente está facilitada, uma vez que apenas no verão se nota uma maior afluência de emigrantes.

A Farmácia Cruz, uma das 4 farmácias existentes na cidade de Cantanhede, emprega 8 farmacêuticos, 1 técnica de farmácia e 1 técnica auxiliar de farmácia que, das 9 às 20 horas de segunda a sexta-feira, e das 9 às 13 horas de sábado, estão disponíveis para aconselhar e ajudar quem a visita. Para além deste horário laboral, a Farmácia Cruz assegura serviço permanente durante uma semana, alternando com as restantes 3 farmácias da cidade.

## 2. ANÁLISE SWOT

### 2.1 Pontos Fortes

#### 1. Formação superior adquirida no MICE

As unidades curriculares de Anatomofisiologia Humana, Farmacoterapia, Indicação Farmacêutica, Virologia, Comunicação e Marketing Farmacêutico, Organização e Gestão Farmacêutica, Fitoterapia, Preparações de Uso Veterinário, Dermofarmácia e Cosmética e Nutrição Humana são apenas algumas das que fazem parte de um plano de estudos que ao longo de 5 anos me preparou para ser uma farmacêutica comunitária habilitada e responsável.

#### 2. Prontidão na aquisição de novos conhecimentos

O mundo está em constante atualização. Diariamente surgem novas circulares na ANF Online, novas regras para o funcionamento da farmácia comunitária, novas recomendações para a remoção de medicamentos do mercado, novos fármacos com vantagem terapêutica, novos produtos de saúde com indicações específicas e novas *guidelines* com objetivos terapêuticos diferentes que exigem a atenção e a procura constante pela atualização do conhecimento por parte do farmacêutico.

#### 3. Capacidade de trabalho com plataformas de imagem e pensamento criativo

Uma das principais formas de comunicação com o público da farmácia é através da imagem, sendo, por isso, essencial que o material publicitário no espaço da farmácia e nas redes sociais passem uma mensagem simples, clara, factual e apelativa.

#### 4. Capacidade de organização documental e gestão do espaço físico

As tarefas na farmácia comunitária exigem responsabilidade e capacidade organizativa do farmacêutico. Essas tarefas incluem: a receção e gestão de encomendas e devoluções, a regularização de faturas, a faturação, a emissão de notas de crédito e de débito, a gestão de reservas pagas e não pagas, o registo de entrada e saída de benzodiazepinas/psicotrópicos, a arrumação dos Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM) em gavetas por ordem alfabética e de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) e outros produtos de saúde em prateleiras e lineares por área terapêutica e/ou forma farmacêutica, a avaliação da conformidade das condições de temperatura e humidade através de termohigrómetros, a reposição de lineares, a atualização de promoções e a recolha da Valormed.

## 5. Empatia e apetência para um bom relacionamento interpessoal

Trabalhar numa farmácia comunitária implica saber trabalhar em equipa e ter uma boa relação com todos os colegas farmacêuticos e não farmacêuticos. A Farmácia Cruz ensinou-me que só dessa forma se consegue ter um ótimo ambiente no trabalho, onde a confiança e o respeito pelo outro presidem.

## 2.2 Pontos Fracos

### 1. Dificuldade na associação dos nomes comerciais dos medicamentos aos respetivos princípios ativos

No mercado existem inúmeras indústrias farmacêuticas a comercializar um mesmo princípio ativo sob diferentes nomes, com os quais não estava familiarizada.

### 2. Inexperiência na organização administrativa e comercial da farmácia

Os MSRM podem ser comparticipados por inúmeras entidades para além do Serviço Nacional de Saúde (SNS). Como desconhecia esta realidade, a verificação dos requisitos das receitas médicas manuais (cada vez menos comuns) bem como a realização de faturação no final do mês (que inclui a emissão de lotes, do resumo de lotes e da fatura) são funções que requerem alguma aprendizagem.

### 3. Ausência dos cursos de Suporte Básico de Vida e de Administração de Vacinas e Medicamentos Injetáveis

Na farmácia comunitária podem surgir situações de urgência nas quais ainda não estou preparada para atuar. Por outro lado, sendo a administração de vacinas e de outros injetáveis um dos serviços disponibilizados na farmácia, torna-se fundamental que este curso venha a fazer parte do meu currículo.

## 2.3 Oportunidades

### 1. Estágio de uma semana numa farmácia em contexto distinto

Numa das semanas de estágio tive a oportunidade de conhecer a Farmácia S. Damião que, pertencendo a uma aldeia, serve uma população mais pequena e tendencialmente idosa. Consequentemente, o farmacêutico consegue estabelecer uma relação mais próxima com o utente e acompanhar mais rigorosamente o utente e a sua medicação.

## 2. Participação em formações online

No decorrer dos 4 meses de estágio tive a oportunidade de alargar o meu conhecimento no ramo da Dermofarmácia e Cosmética, através de formações *online* das marcas A-Derma<sup>®</sup>, Avène<sup>®</sup>, Bioderma<sup>®</sup>, Caudalie<sup>®</sup>, Elgydium<sup>®</sup>, Puresentiel<sup>®</sup> e René Furterer<sup>®</sup>. Assisti ainda a *webinars* sobre obstipação e diarreia, novas soluções terapêuticas na diabetes tipo 2, nutrição clínica, proteção solar e sobre oportunidades para a farmácia em tempo de pandemia. Para além disso, os meus colegas farmacêuticos demonstraram-se sempre disponíveis para me explicar gamas de produtos com as quais não estava familiarizada.

## 3. Contacto com ambas as versões do sistema informático Sifarma<sup>®</sup>

O Sifarma<sup>®</sup> é a ferramenta de gestão e atendimento da Farmácia Cruz, utilizado para gestão de stocks, encomendas, reservas, devoluções, produtos e utentes e na avaliação do desempenho da farmácia. O Sifarma<sup>®</sup> é também utilizado no atendimento, garantindo que este seja o mais eficaz e eficiente possível. Apesar da Farmácia Cruz já ter implementado a nova versão (Sifarma+<sup>®</sup>) e a utilizar na maioria das suas funções, outras tarefas ainda exigem a versão antiga (Sifarma 2000<sup>®</sup>). Por isso, fui instruída a utilizar ambas as versões.

## 4. Preparação de medicamentos manipulados

Um dos espaços obrigatórios de que as farmácias comunitárias devem dispor é o laboratório, para que sempre que necessário possam ser preparados medicamentos manipulados. Entre abril e agosto, a Farmácia Cruz foi requisitada para preparar dois medicamentos manipulados distintos: uma solução bucal de Mycostatin<sup>®</sup>, Lidonostrum<sup>®</sup> e bicarbonato de sódio; e um creme para aplicação tópica de enxofre e vaselina para tratamento de escabiose. Desta forma foi-me possível aplicar o conhecimento adquirido em unidades curriculares como Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica. Para além disso, tive oportunidade de apurar a utilização das ferramentas do Microsoft Excel<sup>®</sup> úteis no cálculo do preço dos medicamentos manipulados (Anexo I).

## 5. Entrega ao domicílio e a lares do concelho

A entrega de medicamentos ao domicílio e a lares é um dos serviços prestados pela Farmácia Cruz que vem reforçar a importância do papel do farmacêutico no apoio a doentes com incapacidade física ou a utentes que por motivos de saúde pública (exemplo da infeção por SARS-CoV-2) não devem sair de casa. A resposta eficiente dos farmacêuticos aos pedidos de entrega ao domicílio (recebidos geralmente por telefone) e aos pedidos de medicação para utentes do lar (recebidos por *email*) veio reforçar a imagem que eu tenho do farmacêutico

como um profissional que tem sempre como primeiro interesse a saúde e o bem-estar do utente, valorizando e honrando a profissão.

#### 6. Dispensa de medicamentos hospitalares

A pandemia COVID-19 obrigou o país a adotar medidas de saúde pública que minimizassem a transmissão do SARS-CoV-2 e a sobrecarga do SNS. Uma dessas medidas passou pela dispensa de medicamentos hospitalares nas farmácias comunitárias de forma a restringir o número de pessoas que visitam os hospitais. Este serviço, que em circunstâncias normais não teria tido oportunidade de experienciar, é realizado através da ferramenta Sifarma Clínico® e contribui para a partilha de informação entre farmácias e unidades de saúde.

#### 7. Integração numa farmácia que se guia pelo regime KAIZEN

Focado na rentabilidade e melhoria contínua, o regime KAIZEN (palavra de origem japonesa que significa “mudança para melhor”) tem sido recentemente implementado nas farmácias comunitárias, das quais é exemplo a Farmácia Cruz. Este regime apoia-se no ciclo PDCA (*Plan, Do, Check, Act*), abordado na unidade curricular de Gestão e Garantia da Qualidade. Ao integrar uma farmácia que se orienta pelo regime KAIZEN, e que nesse âmbito realiza frequentemente reuniões de equipa, tive a oportunidade de desenvolver um pensamento crítico, metódico e estratégico.

#### 8. Preparação da transferência de uma farmácia

Durante o período de estágio na Farmácia Cruz assisti à transferência de uma farmácia do grupo. Assim, vi ser colocados em prática conteúdos lecionados nas unidades curriculares de Deontologia e Legislação Farmacêutica e de Organização e Gestão Farmacêutica, nomeadamente no que se relaciona com o cumprimento de requisitos de localização e espaço físico da farmácia e atribuição de alvará após inspeção favorável pelo Infarmed.

#### 9. Período pós-estágio na Farmácia Cruz no seguimento do estágio curricular

Tão importante quanto o esforço e dedicação que empenhei durante os últimos 5 anos enquanto estudante de Ciências Farmacêuticas, é o reconhecimento pelos mesmos. Por isso, ter tido o privilégio de continuar a enriquecer a minha formação em período pós-estágio com a equipa da Farmácia Cruz, que desde o início me fez sentir um membro do grupo, foi mais um motivo para querer continuar a crescer e a aprender.



## 10. Crescimento pessoal e profissional

A unidade curricular “Estágio Curricular” é uma oportunidade de crescimento não só profissional, mas também pessoal. O estágio na Farmácia Cruz foi fundamental para anular muitos dos pontos fracos acima referidos: hoje sou mais conhecedora do procedimento de faturação às várias entidades e organismos que compõem os MSRM e tenho mais facilidade em associar os nomes comerciais dos medicamentos aos princípios ativos neles contidos. Por outro lado, experienciei atendimentos que me tornaram numa pessoa mais racional e responsável e vivi no núcleo de uma equipa que me deu ferramentas para saber agir e responder a qualquer situação que possa surgir na farmácia comunitária.

### **2.4 Ameaças**

#### 1. Impossibilidade de assistir a formações presenciais e de participar em ambientes sociais face à pandemia COVID-19

Face ao contexto atual da pandemia COVID-19, nas formações online que realizei não tive a oportunidade de contactar com outros profissionais do ramo farmacêutico nem de experimentar os novos produtos lançados no mercado.

#### 2. Espaço e tempo limitantes no que concerne à intervenção farmacêutica

A Farmácia Cruz tem uma disposição retangular e estreita, o que acrescentado à utilização obrigatória de máscara e à existência de acrílicos protetores ao balcão, dificulta a comunicação entre o farmacêutico e o utente. Por outro lado, face à pandemia COVID-19, apenas alguns dos balcões de atendimento estão disponíveis, pressionando um diálogo mais célere entre o farmacêutico e o utente, especialmente nos períodos do dia de maior afluência à farmácia.

#### 3. Horário de estágio exaustivo

A obrigação do cumprimento de 810 horas de estágio em farmácia comunitária poderia ter sido uma ameaça, uma vez que a minha opção pela realização de dois estágios, em Indústria Farmacêutica e Farmácia Comunitária, consome muito tempo. No entanto, a Farmácia Cruz demonstrou sempre bastante cuidado e abertura no horário do estágio. Por outro lado, a disponibilização da Época Especial pela FFUC é também tranquilizante no que respeita ao período temporal que me oferece até à entrega da Tese de Mestrado.

### 3. CASOS PRÁTICOS

#### Caso Prático I: INDICAÇÃO FARMACÊUTICA – OBSTIPAÇÃO

Um utente de 68 anos dirigiu-se à Farmácia Cruz com uma embalagem vazia de Normalax<sup>®</sup> e, insatisfeito com aquele medicamento, questionou-me se Dulcolax<sup>®</sup> não seria mais eficaz. Questionei o utente há quanto tempo andava a tomar Normalax<sup>®</sup> e se o tomava frequentemente. Disse-me que era habitual tomá-lo e que já não se lembrava de quando tinha iniciado aquela medicação.

Após conversar com o utente e perceber que este costumava ter “prisão de ventre”, que as suas fezes eram duras e que tinha alguma relutância na ingestão de água, expliquei ao senhor que, tão ou mais importante que a medicação, são os hábitos alimentares e o estilo de vida. Assim, aconselhei o utente a fazer uma dieta rica em fibras e a beber água, a fazer alguma atividade física, e, por último, a educar o seu intestino a defecar diariamente segundo um horário regular.

Para além das medidas não farmacológicas, e indo de encontro ao que o utente procurava, expliquei-lhe ainda que Normalax<sup>®</sup> e Dulcolax<sup>®</sup> são medicamentos com a mesma substância ativa (Bisacodilo) na mesma dosagem (5 mg) e que ambos não são aconselhados para uso prolongado pois provocam a síndrome de abuso dos laxantes de contacto, perdendo o efeito desejado. Assim, aconselhei o utente a substituir o laxante de contacto por um laxante osmótico (como Laevolac<sup>®</sup> xarope ou saquetas), que sendo mais fisiológico, não exige a ingestão de muita água como aconteceria com um laxante expansor do volume fecal.

Um dos serviços mais prevalente na farmácia comunitária é a indicação farmacêutica. Durante os 4 meses de estágio tive a oportunidade de intervir em inúmeras situações nas quais os utentes procuram o farmacêutico como o profissional de saúde que deles está mais próximo e que está disponível durante 24 horas.

## **Caso Prático 2: TROCA DE MEDICAÇÃO SEM RECEITA MÉDICA**

Um utente de 85 anos deslocou-se à farmácia com uma receita médica. Antes de mais, explicou-me que tomava Pradaxa<sup>®</sup> 110 mg (cujo princípio ativo é Dabigatrano) e que a sua médica lhe tinha dito que quando a quantidade deste medicamento na receita terminasse, o senhor passaria a tomar Lixiana<sup>®</sup> (cujo princípio ativo é Edoxabano), tal como vinha escrito à mão na receita, presumivelmente pela médica. Confirmei na ficha do senhor que este tomava Pradaxa<sup>®</sup> 110 mg há muito tempo e dado que a receita que me apresentava já não tinha Pradaxa<sup>®</sup> 110 mg para dispensar, questionei-o sobre a receita médica de Lixiana<sup>®</sup>. Apercebi-me que o senhor a teria perdido porque não a trazia consigo.

Encontrei-me numa situação na qual, por um lado sabia que o senhor não tinha receita médica para o Pradaxa<sup>®</sup> 110 mg, a que estava habituado, e sabia que deveria trocar para Lixiana<sup>®</sup>, mas por outro lado não sabia a dosagem do Lixiana<sup>®</sup> que a médica tinha recomendado. Por isso, não sendo prudente ceder qualquer um dos medicamentos, tentei saber qual a dosagem de Lixiana<sup>®</sup> contactando a sua médica e solicitando que enviasse a receita médica para o endereço de *email* da Farmácia Cruz. Nesta conversa com a médica soube que o senhor iria trocar de medicação porque não estava a cumprir a posologia de Pradaxa<sup>®</sup> 110 mg (2 vezes por dia). Por isso, lembrei o senhor que deveria cumprir a posologia de Lixiana<sup>®</sup> 60 mg e tomar sempre um comprimido por dia à mesma hora para evitar o esquecimento.

O farmacêutico é para muitos cidadãos visto não só como um profissional de saúde, mas também como um amigo que se encontra sempre disponível. A tranquilidade e o sentimento de gratidão com que o utente acima referido saiu da Farmácia Cruz, faz-me crer que esta profissão vai muito além da dispensa de medicamentos.

### **Caso Prático 3: NOVA MEDICAÇÃO SEM RECEITA MÉDICA**

No dia 19 de julho, um utente de 75 anos surgiu na farmácia com um documento que trazia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), onde tinha estado internado. O documento fornecido ao utente (Anexo 2) indicava que o utente deveria deixar de tomar Enalapril + Hidroclorotiazida, para passar a tomar Amlodipina 5 mg. No entanto, o utente não trazia consigo a receita médica com a prescrição de Amlodipina 5 mg e disse-me que antes da sua consulta no dia 6 de setembro iria pedi-la à médica. Acrescentou ainda que apesar de ainda ter Enalapril + Hidroclorotiazida em casa, não o tomava e que tinha medido a sua tensão arterial recentemente e estava a 160/90 mmHg.

Face ao exposto e sabendo que o utente tomava também Sinvastatina (indicador de hipercolesterolemia), Alopurinol (indicador de um doente com gota) e Vildagliptina (indicador de um doente diabético), concluí que a Hidroclorotiazida (diurético tiazídico) não seria a melhor opção para baixar a tensão arterial do utente, uma vez que esta é altamente desmetabolizante (aumentando os níveis de ácido úrico, de triglicéridos e de glicémia). Assim, a solução passou por contactar o médico, solicitando que enviasse para o email da Farmácia Cruz a receita médica com a prescrição de Amlodipina 5 mg e alertar o utente para a importância de tomar este bloqueador da entrada de cálcio vasosseletivo uma vez por dia.

Na farmácia surgem desafios diariamente. Este estágio revelou que a saúde e o bem-estar do utente são o principal interesse do farmacêutico. Por isso, situações urgentes e críticas como esta, apelam à consciência, responsabilidade e competência do farmacêutico que com todo o seu conhecimento deve responder à situação que lhe é apresentada.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

No dia 11 de abril, véspera do início do estágio na Farmácia Cruz, receava os 4 meses que se avizinhavam. Hoje, estou grata à FFUC e à Farmácia Cruz por me terem dado a oportunidade mais desafiadora e surpreendente destes 5 anos.

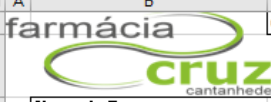
Neste estágio desenvolvi a minha capacidade de comunicação com o outro e aprendi a transmitir confiança e a não recear a veracidade de conhecimento que a FFUC me deu. Aprofundei ainda o meu saber no que se relaciona com a indicação farmacêutica e comecei a perceber a responsabilidade que um farmacêutico comunitário tem aquando do aconselhamento farmacêutico.

Apercebi-me que a farmácia vai muito além de um local de cedência de medicamentos e de produtos de saúde e bem-estar: somos uma equipa atenta ao meio envolvente com o objetivo de prestar um serviço adequado à população e disponível para solucionar os mais variados problemas que surgem diariamente e que só no terreno nos apercebemos que existem. Para isso e para cumprirmos com o que nos move é crucial conhecer o utente, ter uma equipa bem formada e atualizada e ter uma oferta adequada às suas necessidades.

Apesar do conhecimento não se esgotar e de saber que terei sempre algo mais para aprender, saio deste estágio com a certeza que as 58 unidades curriculares que realizei na FFUC foram imprescindíveis, mas não suficientes para exercer com responsabilidade a função de um farmacêutico. A Farmácia Cruz deu-me a base necessária para agora continuar a crescer profissionalmente e me tornar na farmacêutica comunitária que há 4 meses atrás não ambicionava ser.

# ANEXOS

## ANEXO I – Ficha de preparação de medicamentos manipulados.

A	B	C	D	E	F	G	H	I
1		QUANTIDADE	50	LOTE			Data	
2	<b>Manipulado</b>							
3	<b>Nome do Doente</b>							
4	<b>Posologia</b>							
5	<b>Via de Administração</b>							
6								
7	<b>Matérias Primas</b>							
8		<b>Matéria Prima 1</b>	<b>Matéria Prima 2</b>	<b>Matéria Prima 3</b>	<b>Matéria Prima 4</b>	<b>Matéria Prima 5</b>	<b>Matéria Prima 6</b>	
9	Lote				-	-	-	
10	Preço Custo Embalagem (s/IVA)							
11	Quantidade Embalagem							
12	Preço Custo Unitário (s/IVA)	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	
13	Quantidade				0,000000	0,000000	0,000000	
14	Custo da Quantidade Necessária	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	
15								
16	<b>Factor Multiplicativo</b>							
17	Kg	1,3	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
18	Hg	1,6	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
19	Dg	1,9	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
20	g	2,2	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
21	dg	2,5	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
22	cg	2,8	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
23								<b>TOTAL Mat. Primas</b>
24	<b>Factor Multiplicativo</b>	<b>5,05 l</b>						#DIV/0!
25	<b>0,05</b>							
26			Quant// Base	Honorários 1	Quant// Extra	Factor2	Honorários 2	Total Honorários
27	Pomadas, Geles, Pomadas de incorporação de subst activas em sist pré-preparados industrial/		até 100g	13,71 €	- €	0,01 €	- €	13,71 €
29	Pastas			20,57 €	- €	0,01 €	- €	20,57 €
30	Cremes			41,13 €	- €	0,02 €	- €	41,49 €
31								
32	Soluções Liq de incorporação de subst activas em sist pré-preparados industrial/			13,71 €	- €	0,01 €	- €	13,71 €
33	Xaropes		até 100g/100ml	41,13 €	- €	0,01 €	- €	41,13 €
34	Suspensões			20,57 €	- €	0,01 €	- €	20,57 €
35	Emulsões			41,13 €	- €	0,01 €	- €	41,13 €
36								
37	Papéis Medicamentosos		até 10 unil/s	27,42 €	- €	0,10 €	- €	27,42 €
38	Cápsulas		até 50 unil/S	20,57 €	- €	0,01 €	- €	20,57 €
39	Pós Compostos		até 100g	13,71 €	- €	0,00 €	- €	13,71 €
40	Granulados			20,57 €	- €	0,01 €	- €	20,57 €
41	Comprimidos		até 10 comp	27,42 €	- €	0,10 €	- €	27,42 €
42	Supositórios/ Ovulos		até 10 unil/s	27,42 €	- €	0,01 €	- €	27,42 €
43								
44	Soluções Estéreis		até 100g/100ml	20,57 €	- €	0,01 €	- €	20,57 €
45	Soluções Injectáveis		até 10 ampolas	27,42 €	- €	0,10 €	- €	27,42 €
46	Suspensões Injectáveis			38,85 €	- €	0,14 €	- €	38,85 €
47								
48								
49								
50								
51								
52	<b>Matérias de Embalagem</b>		<b>PVP do Manipulado</b>					
53	Preço Custo (s/IVA)	1,20 l						
54	Quantidade							
55	Factor	1,20						
56	Total	-						
57								
58								
59								
60								
61								
62	<b>Dispositivos auxiliares de Administração</b>							
63	Dispositivo							
64	Quantidade	- €						
65	Preço	- €						
66	Total dos Dispositivos	- €						
67								
68								
69								
70	<b>Preparação</b>						<b>Operador</b>	
71	1							
72	2							
73	3							
74	4							
75	5							
76	6							
77	7							
78	8							
79	9							

ANEXO 2 – Documento do CHUC apresentado pelo utente na Farmácia Cruz.

	Peq almoço	Almoço	Jantar
Ácido acetilsalicico 150mg	Tas múltiplas	1	para sangue
Alopurinol 300mg	1	crádo ilica	
Sinvastatina 20mg	1	colásterol	
Vildagliptina 50mg	1	diabetes	
Tansulosina 0.4mg	Prostata		1

*Amlodipina 5mg id tensão arterial*

Mantém cefuroxima 500mg de 12/12h durante 7 dias.

Suspende Enalapril + hidroclorotiazida, fenofibrato, furosemida e metformina.

Deve vigiar tensão arterial. Se valores em ambulatório > 140/90 mmHg deve iniciar amlodipina 5mg id (até ao máximo de 10mg por dia).

Deve dirigir-se ao Médico Assistente para reavaliação clínica após a alta.

# **PARTE 2**

## **Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica**

### **LABORATÓRIOS BASI – DEPARTAMENTO DE I&D Mortágua**

Sob orientação da Dra. Cátia Augusto.



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AIM</b>	Autorização de Introdução no Mercado
<b>BCS</b>	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
<b>CTD</b>	<i>Common Technical Document</i>
<b>EMA</b>	Agência Europeia de Medicamentos
<b>FFUC</b>	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
<b>HMA</b>	<i>Heads of Medicine Agencies</i>
<b>I&amp;D</b>	Investigação e Desenvolvimento
<b>IJM</b>	<i>Injectable Manufacture</i>
<b>LSM</b>	<i>Liquid Semi-solid Manufacture</i>
<b>MICF</b>	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
<b>PAR</b>	<i>Public Assessment Report</i>
<b>QbD</b>	<i>Quality by Design</i>
<b>RCM</b>	Resumo das Características do Medicamento
<b>SWOT</b>	<i>Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats</i>

## INTRODUÇÃO

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) oferece a possibilidade de realização de um estágio curricular em Indústria Farmacêutica, para além do estágio curricular obrigatório em Farmácia Comunitária. Por isso, e com o objetivo de complementar a minha formação, realizei um estágio no Departamento de Investigação e Desenvolvimento (I&D) dos Laboratórios Basi, S.A., em Mortágua, com início no dia 11 de janeiro de 2021 e término no dia 9 de abril de 2021, sob orientação da Dra. Cátia Augusto.

O presente relatório de estágio em Indústria Farmacêutica assume a forma de uma análise SWOT, onde são evidenciados os fatores internos - pontos fortes (*Strengths*) e pontos fracos (*Weaknesses*) que me caracterizavam no início do estágio e que foram relevantes para o meu desempenho enquanto estagiária - bem como os fatores externos - oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*) que o estágio revelou.

### I. LABORATÓRIOS BASI – DEPARTAMENTO DE I&D

Os Laboratórios Basi são uma empresa fundada em 1956 que desenvolve, fabrica, comercializa e distribui medicamentos [1]. Esta empresa está integrada no grupo FHC I Farmacêutica, S.A., conjuntamente com a Empifarma - Produtos Farmacêuticos, S.A., a Overpharma - Produtos Médicos e Farmacêuticos, Lda., a Phagecon - Serviços e Consultoria Farmacêutica, Lda. e a Zeone - Informática, Lda [2].

Esta empresa possui duas unidades de fabrico: LSM (*Liquid Semi-solid Manufacture*) onde decorre a produção de preparações líquidas e semi-sólidas e IJM (*Injectable Manufacture*) onde decorre a produção de injetáveis [2]. O departamento de I&D está localizado na LSM e tem uma equipa que integra farmacêuticos, engenheiros químicos e químicos. Este departamento está dividido em duas secções: uma dedicada ao e outra de desenvolvimento farmacêutico e a de desenvolvimento e validação analítica. No entanto, o departamento de I&D também a responsabilidade da elaboração de algumas secções do *Common Technical Document* (CTD) para submissão às autoridades, sendo esta variante designada por *CMC New Products* [3].

## 2. ANÁLISE SWOT

### 2.1 Pontos Fortes

#### 1. Formação superior adquirida no MICE

As unidades curriculares de Tecnologia Farmacêutica, Métodos Instrumentais de Análise, Biofarmácia e Farmacocinética, Gestão e Garantia da Qualidade e Assuntos Regulamentares do Medicamento contribuíram para um maior aproveitamento do estágio e permitiram que o meu desempenho como estagiária e como futura farmacêutica fosse o melhor.

#### 2. Autonomia no trabalho e cumprimento de prazos

Na indústria farmacêutica, nomeadamente no departamento de I&D, é fundamental que exista comunicação entre toda a equipa. No entanto, o trabalho que ali se desenvolve é também muito individual, pelo que o farmacêutico deve ter a capacidade de ser autónomo na execução das tarefas que lhe são atribuídas. Por outro lado, a responsabilidade no cumprimento de prazos é também importante numa indústria onde todos os departamentos se relacionam e dependem uns dos outros.

#### 3. Capacidade de pesquisa

No departamento de I&D existe uma forte vertente de pesquisa pela informação mais recente e atualizada. Por essa razão, para que todo o trabalho desenvolvido neste departamento tenha a qualidade exigida a qualquer produto ali desenvolvido, é fundamental que sejam utilizadas as melhores e mais fiáveis fontes de informação científica.

#### 4. Experiência em trabalho laboratorial

O departamento de I&D dos Laboratórios Basi tem três espaços: o *openspace*, onde decorre o trabalho de investigação e a discussão de ideias, o laboratório de I&D, onde é realizado o desenvolvimento farmacêutico dos diferentes produtos, e o laboratório de desenvolvimento e validação analítica. Assim, as aulas laboratoriais no decurso do MICE, bem como a oportunidade que tive de realizar um estágio extracurricular no laboratório de Farmácia Galénica sob orientação da Professora Maria Eugénia Pina, prepararam-me para uma maior destreza na realização de atividades laboratoriais desenvolvidas durante o estágio.

## 5. Familiaridade com a língua inglesa

O conhecimento da língua inglesa é fundamental num departamento onde os artigos científicos, os livros (como por exemplo o *Handbook of Pharmaceutical Excipients* e o *Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations*), a farmacopeia (*European Pharmacopeia 10.0*), as *guidelines* (como por exemplo a *Guideline on the Investigation of Bioequivalence*) e os documentos oficiais (como por exemplo os *Public Assessment Reports (PAR)*, os CTD e as patentes dos medicamentos) estão escritos em inglês.

### 2.2 Pontos Fracos

#### 1. Pouca familiaridade com línguas estrangeiras além da inglesa

O desenvolvimento de um medicamento genérico passa pela avaliação de medicamentos equivalentes já existentes a nível europeu. Por isso, a consulta de bases de dados de países como Espanha, Reino Unido, Irlanda, Alemanha, Polónia, Itália, Holanda e França exige alguma destreza na leitura de documentos escritos nas respetivas línguas.

#### 2. Inexperiência em trabalhar no terreno

No final do primeiro semestre do quinto ano do MICEF, o contacto que tinha com a realidade empresarial era mínima, dificultando a minha autonomia em tarefas que me foram propostas pela equipa do departamento de I&D. Por isso, o MICEF na FFUC, ao terminar com a unidade curricular “Estágio Curricular”, deu-me as ferramentas necessárias para exercer numa indústria farmacêutica com a melhor imagem profissional e qualidade de trabalho.

### 2.3 Oportunidades

#### 1. Integração numa equipa de I&D da indústria farmacêutica

O farmacêutico é o profissional de saúde que tem maior conhecimento sobre o medicamento. Assim, tem a capacidade de exercer cargos em locais como a indústria farmacêutica, a farmácia comunitária, a farmácia hospitalar e o laboratório de análises. Ter tido a oportunidade de integrar a equipa do departamento de I&D dos Laboratórios Basi, que desde início me acolheu e se mostrou disponível para me formar, fez com que passasse a conhecer a responsabilidade, a exigência e o rigor que fazem parte do dia a dia de quem ali trabalha. Para isso foi fundamental o computador portátil que me foi facultado durante os três meses de estágio e a integração no grupo do Microsoft Teams® da empresa para que mantivesse o contacto constante com todos os membros da equipa.

## 2. Participação em formações de integração na empresa

Nos primeiros dias como estagiária nos Laboratórios Basi assisti a formações sobre a estrutura física e organizacional da empresa, sobre boas práticas de fabrico e sobre higiene e segurança no trabalho. Posteriormente, participei numa visita guiada pelas instalações da empresa e, inclusivamente, pelo departamento de I&D. Desta forma, tive a oportunidade de conhecer a realidade de uma indústria farmacêutica que tem mais de 240 medicamentos registados no mercado [3].

## 3. Participação na elaboração de algumas partes da secção 3.2.P.2 do CTD

A consecução do CTD passa pela caracterização da substância ativa (secção 3.2.P.2.1.1), exigindo a pesquisa de informações como: a solubilidade em diferentes solventes e em função do pH, o pKa, o ponto de fusão, a classificação de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS), a quiralidade, o polimorfismo, o tamanho de partícula, a estabilidade (fotolítica, oxidativa, térmica e de acordo com o pH), os produtos de degradação, o mecanismo de ação, a farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e eliminação) e a eficácia e segurança clínicas comprovadas até ao momento. Posteriormente à caracterização da substância ativa, é necessário descrever todos os excipientes utilizados na formulação (secção 3.2.P.2.1.2), caracterizando a sua função na formulação e a sua aplicação e concentração habituais nas formulações farmacêuticas, bem como a sua solubilidade, estabilidade e atividade. Ainda relativamente aos excipientes, é necessário demonstrar que as concentrações utilizadas na preparação da formulação para a via de administração prevista (uma suspensão oral no caso que me foi proposto) não são tóxicas.

## 4. Realização de pesquisa de mercado

Uma das tarefas a realizar pelo departamento de I&D quando do desenvolvimento de um produto é a pesquisa de mercado e o levantamento bibliográfico dos medicamentos equivalentes existentes noutros mercados. A Agência Europeia de Medicamentos (EMA), que coordena os procedimentos centralizados, e a *Heads of Medicine Agencies* (HMA), que coordena os procedimentos descentralizados, têm bases de dados que podem ser consultadas pelas indústrias farmacêuticas para obtenção do Resumo das Características do Medicamento (RCM) e do PAR, que inclui informação sobre, por exemplo, o processo de fabrico e a estratégia pré-clínica e clínica utilizada. Para além destas bases de dados de medicamentos, podem também ser consultadas bases de dados nacionais, como por exemplo o Infomed (de Portugal). Após a análise de mercado é necessário compilar toda a informação sobre nome do produto, mercado a que pertence, substância ativa, dosagem, forma farmacêutica, composição

qualitativa e quantitativa, material de acondicionamento, prazo de validade, condições de armazenamento, posologia, indicações terapêuticas, se é ou não genérico, detentor de Autorização de Introdução no Mercado (AIM) e se está a ser ou não comercializado, para posterior comparação e análise.

#### 5. Elaboração do Relatório de Desenvolvimento

Nos Laboratórios Basi, o desenvolvimento de um produto tem quatro fases. Neste estágio tive a oportunidade de experienciar a fase I, na qual é elaborado um Relatório de Desenvolvimento com uma caracterização geral do projeto. Este relatório resume as conclusões obtidas da pesquisa de mercado, nomeadamente no que se relaciona com a composição, dosagem, prazo de validade e condições de conservação e acondicionamento, caracterizando o produto que se pretende desenvolver. Para além disso, é neste relatório que é feita a proposta de estratégia de desenvolvimento referindo os requisitos para a preparação da formulação. Esta proposta pode, por exemplo, referir a necessidade de uma atmosfera de azoto, o pH indicado para manter estável a substância ativa e o método de esterilização mais adequado. Por último, são mencionados os pontos críticos e os custos da produção da formulação.

No caso da proposta ser aprovada seguem-se a fase 2 de desenvolvimento do produto, a fase 3 de desenvolvimento industrial (*scale-up*) e a fase 4 de registo do medicamento.

#### 6. Desenvolvimento de pensamento crítico e metódico

Neste estágio nos Laboratórios Basi aprendi a ter um raciocínio crítico, metódico e estratégico no que se relaciona com a investigação e o desenvolvimento de novos medicamentos e com o cumprimento de prazos. O departamento de I&D é onde tudo começa e, por isso, é essencial que a equipa de I&D tenha conhecimento e destreza para responder às necessidades da empresa e seja capaz de identificar possíveis pontos críticos no desenvolvimento de uma nova formulação.

#### 7. Crescimento profissional

O plano de estudos do MICF na FFUC é muito vasto e tem a mais valia de terminar com a unidade curricular “Estágio Curricular”. Apesar de conhecer conceitos como o *Quality by Design* (QbD) e de conhecer os módulos do CTD, este estágio foi fundamental para consolidar a matéria teórica lecionada em unidades curriculares como as de Tecnologia Farmacêutica e de Assuntos Regulamentares do Medicamento. Para além disso, contactei com

as bases de dados de medicamentos de inúmeros países europeus e conheci novas fontes de informação científica.

## 2.4 Ameaças

### 1. Curto período de tempo em trabalho presencial

Face à pandemia COVID-19 apenas trabalhei presencialmente durante um mês, o que dificultou o meu aproveitamento do estágio curricular. No entanto, durante o período em que fiquei em casa tive a oportunidade de dar continuidade ao trabalho que estava a desenvolver nos Laboratórios Basi. Foi-me facultado todo o apoio por parte da equipa do departamento de I&D, que, durante dois meses, se disponibilizaram para me continuar a formar remotamente.

### 2. Pouco contacto com as restantes vertentes do departamento de I&D

O departamento de I&D funciona em três espaços: o *openspace*, o laboratório de I&D e o laboratório de desenvolvimento e validação analítica. Apesar de se complementarem, as equipas que estão nestes espaços são diferentes e desenvolvem trabalhos distintos. Por isso, acredito que a única participação que tive no laboratório de I&D (na preparação de uma solução para perfusão) não foi suficiente para ter uma visão global do departamento de I&D.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Desde o início do meu percurso acadêmico na FFUC que desenvolvi um particular interesse pelas etapas às quais os medicamentos têm de ser submetidos para obtenção de AIM. Um percurso que poderia aparentar ser simples, é, pelo contrário, bastante moroso e dispendioso.

Este estágio nos Laboratórios Basi deu-me a possibilidade de acompanhar e de participar em etapas cruciais como a realização do módulo 3 da qualidade do CTD, nomeadamente nas secções 3.2.P.2.1.1 (relativa à caracterização da substância ativa) e 3.2.P.2.1.2 (relativa à caracterização dos excipientes), na demonstração de como as concentrações dos excipientes não apresentam toxicidade, na pesquisa de mercado e na elaboração do relatório de desenvolvimento. Para além disso, apesar de pouco frequente, visitei o laboratório de I&D e acompanhei algumas das tarefas nele realizadas, colocando em prática o estudo previamente realizado por toda a equipa deste departamento.

O estágio curricular de 3 meses que a FFUC e os Laboratórios Basi me ofereceram foi fundamental para conhecer a realidade da indústria farmacêutica, nomeadamente o trabalho que lá é desenvolvido, a exigência no cumprimento de prazos e a responsabilidade envolvida para que todas as formulações ali desenvolvidas tenham qualidade e sejam seguras e eficazes.

Todo o conhecimento e destreza que têm de estar envolvidos na primeira etapa de pesquisa da molécula para o alvo de interesse, bem como o tempo envolvido e a troca de ideias implícita nesta fase, fez-me crer que o departamento de I&D é necessário e indispensável numa indústria farmacêutica que procura não só desenvolver medicamentos genéricos, mas também medicamentos inovadores que lhes permitam entrar num mercado cada vez mais competitivo.



## **BIBLIOGRAFIA**

[1] LABORATÓRIOS BASI - **Sobre os basi**. Atual. 2021. Disponível em: <https://www.basi.pt/sobre-basi/>

[2] FHC FARMACÊUTICA - **Um grupo Global**. Atual. 2021. Disponível em: <https://www.fhc.pt/grupo-fhc/>

[3] LABORATÓRIOS BASI - **Relatório & Contas**. Disponível em: <https://www.basi.pt/wp-content/uploads/2021/02/2019.pdf>

# **PARTE 3**

## **Monografia**

### **“TERAPIA MOLECULAR NA INFECÇÃO POR HIV – TENDÊNCIAS E DESAFIOS”**

Sob orientação do Professor Doutor Sérgio Simões.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>(+)ssRNA</b>	RNA cadeia simples de polaridade positiva
<b>AAV</b>	Vírus adeno-associados
<b>ART</b>	Terapêutica Antirretroviral
<b>bnAbs</b>	Anticorpos neutralizantes
<b>bp</b>	Pares de bases
<b>CA</b>	Proteína da cápside
<b>CARs</b>	Recetores Quiméricos de Antígeno
<b>cART</b>	Terapêutica Antirretroviral combinada
<b>CCR5-sgRNA</b>	Cadeia simples de RNA guia cujo alvo é o gene <i>CCR5</i>
<b>CD4bs</b>	Região de ligação à molécula CD4 na gp120
<b>CRISPR</b>	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
<b>dCA</b>	<i>Didehydro-Cortistatin A</i>
<b>DSB</b>	<i>Double-Stranded Break</i>
<b>dsDNA</b>	DNA em dupla cadeia
<b>dsRNA</b>	RNA em dupla cadeia
<b>env</b>	<i>Envelope</i>
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>gag</b>	<i>Group-specific antigen</i>
<b>gRNA</b>	RNA guia
<b>HDACi</b>	Inibidores da Histona Deacetilase
<b>HDR</b>	Reparação Homóloga Dirigida
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>HMTi</b>	Inibidores da Histona H3K9 Metiltransferase
<b>HSPC</b>	Células Estaminais Progenitoras Hematopoiéticas
<b>IN</b>	Integrase
<b>indels</b>	Inserção ou deleção de bases
<b>IV</b>	Intravenoso
<b>LPAs</b>	Agentes Promotores de Latência
<b>LRA</b>	Agentes de Reversão de Latência
<b>MA</b>	Proteína da matriz
<b>MPER</b>	Região Proximal Externa da Membrana
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro

<b>NC</b>	Proteína da nucleocápside
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Fator Nuclear- $\kappa$ B
<b>NgAgo</b>	<i>Natronobacterium gregoryi</i> Argonaute
<b>NHEJ</b>	<i>Non-Homologous End Joining</i>
<b>NK</b>	Células <i>Natural Killer</i>
<b>NnAbs</b>	Anticorpos não neutralizantes
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>P</b>	Protease
<b>PAM</b>	<i>Protospacer Adjacent Motif</i>
<b>PEP</b>	Profilaxia Pós-Exposição
<i>pol</i>	<i>Polymerase</i>
<b>PrEP</b>	Profilaxia Pré-Exposição
<b>RISC</b>	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
<b>RNAi</b>	<i>RNA interference</i>
<b>RVDs</b>	<i>Repeat-Variable Diresidues</i>
<b>SARS-CoV-2</b>	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
<b>scFv</b>	<i>Single chain Fragment variant</i>
<b>shRNA</b>	<i>Short hairpin RNAs</i>
<b>SIDA</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>siRNA</b>	<i>Small interfering RNAs</i>
<b>SIVcpz</b>	Vírus Símeo do chimpanzé
<b>SIVsmm</b>	Vírus Símeo do macaco do Velho Mundo
<b>SU</b>	Proteína de superfície
<b>TALEN</b>	<i>Nucleases Transcription Activator-Like Effector</i>
<b>TAR</b>	<i>Trans-Activation Response element</i>
<b>T<sub>H</sub></b>	Linfócitos <i>T helper</i>
<b>TM</b>	Proteína transmembranar
<b>TR</b>	Trascriptase reversa
<b>TRUCK</b>	<i>T cell Redirected for Universal Cytokine-mediating Killing</i>
<b>UNAIDS</b>	Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/SIDA
<b>VI/V2</b>	Primeiro e segundo domínios variáveis da proteína gp120
<b>V3</b>	Terceiro domínio variável da proteína gp120
<b>ZFN</b>	<i>Nucleases Zinc Finger</i>

## RESUMO

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um retrovírus que, após quatro décadas da sua descoberta, continua a ser motivo para o desenvolvimento e implementação de terapêuticas inovadoras, de intervenções de prevenção e de estratégias comportamentais. Em conjunto, estes permitem o aumento da esperança média de vida das pessoas infetadas, previnem o aparecimento de novas infeções e revertem o percurso da epidemia global de HIV/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA).

A crescente cobertura e disponibilidade da terapêutica antirretroviral (ART), bem como o advento dos regimes antirretrovirais de profilaxia pré-exposição (PrEP) e de profilaxia pós-exposição (PEP) desencadearam uma revolução na resposta à infeção pelo HIV. Ao tornar indetetável a carga viral, contribuem para o aumento do tempo de vida dos indivíduos infetados e reduzem a probabilidade de transmissão do vírus. No entanto, relatórios anuais emitidos pelo Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/SIDA (UNAIDS) reiteram a necessidade de acelerar a resposta HIV/SIDA para prevenir o aumento do número de infeções e de mortes. Desta forma, o interesse nas terapêuticas alternativas e complementares à ART é cada vez maior.

Recentemente, têm sido estudadas estratégias terapêuticas inovadoras que visam a manipulação genética pré e pós-transcrição, o reforço do sistema imune através da imunoterapia e a eliminação do reservatório viral. Contudo, assegurar a eficácia, a segurança e a qualidade da terapêutica é raramente suficiente. A escalabilidade, o custo-efetividade e a capacidade da terapêutica ser implementada em países em desenvolvimento onde o HIV predomina são também importantes. Nesta monografia revemos estas novas terapias, o seu potencial para substituir e complementar a ART e as barreiras que impedem a sua adoção global.

**Palavras-chave:** Vírus da Imunodeficiência Humana, HIV, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, SIDA, Terapêutica Antirretroviral, ART, Terapia Molecular, Terapia Génica, Imunoterapia.

## **ABSTRACT**

The human immunodeficiency virus (HIV) is a retrovirus that, four decades after its discovery, continues to motivate the development and implementation of innovative therapies, prevention interventions and behavioural strategies. Collectively, these aim at increasing the average life expectancy of infected people, preventing the emergence of new infections and reverse the course of the HIV and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) global epidemic.

The growing coverage and availability of antiretroviral therapy (ART), as well as the advent of antiretroviral pre-exposure prophylactic (PrEP) and post-exposure prophylactic (PEP) regimens have sparked a revolution in the response to HIV infection. By making the viral load undetectable, they contribute to an increase in lifespan of infected individuals and reduce the likelihood of transmission of the virus. Still, yearly reports by the joint United Nations programme on HIV/AIDS (UNAIDS) reiterate the necessity to accelerate the HIV/AIDS response to prevent further infections and deaths. Thus, the interest in alternative and complementary therapies to ART is rising.

In recent years, new therapeutic strategies have been targeting pre- and post-transcription genetic manipulation, immune response amplification via immunotherapy and viral reservoir elimination. However, ensuring the efficacy, safety and quality of the therapy is rarely enough. Its scalability, cost-effectiveness and ability to be implemented in the developing countries where HIV predominates are just as paramount. We review these novel therapies, their potential to replace and complement ART and the barriers preventing their widespread adoption.

**Keywords:** Human Immunodeficiency Virus, HIV, Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS, Antiretroviral Therapy, ART, Molecular Therapy, Gene Therapy, Immunotherapy.

## INTRODUÇÃO

Em 1981, no estado da Califórnia, um grupo de clínicos liderado por Michael Gottlieb identificou pela primeira vez casos da doença que, mais tarde, viria a ser conhecida como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). A morte de um grupo específico de pessoas imunodeprimidas devida a infecções causadas por microorganismos oportunistas (mas saprófitas para a maioria da população) levantou a curiosidade de um grupo do Instituto Pasteur liderado por Luc Montagnier e Françoise Barré-Sinoussi que, em 1983, isolou pela primeira vez o Vírus da Imunodeficiência Humana tipo I (HIV-1). Em 2008, Montagnier e Barré-Sinoussi viriam a ser laureados conjuntamente com o Prémio Nobel da Medicina pela sua descoberta. Em menos de três anos, o grupo liderado por Robert Gallo do Instituto Nacional de Cancro dos EUA e uma terceira equipa no estado da Califórnia também isolaram e caracterizaram o HIV-1, estabelecendo uma relação de causalidade entre o vírus e a SIDA [1].

Mais tarde, em meados da década de 80, foi isolado e identificado o HIV-2 por um grupo luso-francês, do qual a farmacêutica portuguesa Odette Ferreira fez parte [2].

O HIV-1 e o HIV-2 são vírus que evoluíram de vírus símios do chimpanzé (SIVcpz) e do macaco do Velho Mundo (SIVsmm), respetivamente, que adquiriram a capacidade de infetar o Homem [3]. No entanto, enquanto o HIV-2 se restringe maioritariamente ao ocidente do continente africano [4], o HIV-1 é o responsável pela epidemia global de HIV/SIDA. Por conseguinte, a presente monografia centra-se no HIV-1 [5].

# I. VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

## I.1 Classificação

O HIV pertence ao género *Lentivirus* da família *Retroviridae* (retrovírus), subfamília *Orthoretrovirinae*. São conhecidos dois tipos de HIV, HIV-1 e HIV-2, que diferem na sequência e na organização do genoma, na distribuição geográfica e na patogenicidade. Em particular, o HIV-1 predomina e é caracterizado por patogenicidade superior. Os vírus HIV-1 são ainda classificados em quatro grupos (M, N, O e P), sendo o grupo M (“maior”) o mais comum [3].

## I.2 Morfologia

O HIV-1 é um vírus envelopado, esférico e que tem aproximadamente 100 nm de diâmetro. Do envelope lipídico fazem parte duas glicoproteínas virais fundamentais para a entrada do vírus na célula hospedeira: a gp120, proteína de superfície (SU) que funciona como proteína de adsorção viral; e a gp41, proteína transmembranar (TM) que suporta a gp120, como ilustrado na Figura 1 [3].

A matriz é a superfície proteica que envolve o interior do envelope, é constituída pela proteína da matriz (p17 ou MA) e reveste exteriormente a cápside. Esta, por sua vez, é formada pela proteína da cápside (p24 ou CA) e inclui no seu interior duas moléculas de RNA cadeia simples de polaridade positiva [(+)ssRNA] envoltas na proteína da nucleocápside (p7 ou NC), bem como três enzimas cruciais para que o HIV incorpore o seu genoma no genoma do hospedeiro e se torne infeccioso: a transcriptase reversa (TR), a protease (P) e a integrase (IN) [3].

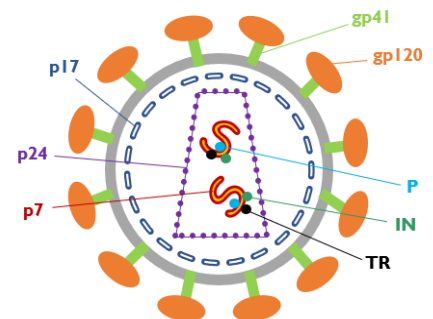


Figura 1. Morfologia do HIV-1.

## I.3 Genoma

Na cápside do HIV-1 encontram-se duas moléculas idênticas (+)ssRNA com cerca de 9 600 nucleótidos no total. O HIV-1 é um retrovírus complexo, do qual se destacam três genes: *gag* (*group-specific antigen*), *pol* (*polymerase*) e *env* (*envelope*). O gene *gag* codifica as proteínas estruturais da cápside, da nucleocápside, e da matriz (p24, p7 e p17) e ainda parte da protease (P). O gene *pol* codifica as enzimas virais transcriptase reversa, protease e integrase (TR, P e IN). Finalmente, o gene *env* codifica as glicoproteínas do envelope (gp120 e gp41) [3].



O HIV-1 tem também genes que codificam proteínas reguladoras (Tat e Rev), necessárias para o início da replicação do HIV, e genes que codificam proteínas acessórias (Nef, Vif, Vpr e Vpu) importantes na replicação viral, na libertação do vírus da célula hospedeira e na sua patogénese [6]. Pelo contrário, o HIV-2 tem a proteína Vpx em substituição da Vpu, sendo essa uma das justificações para que este tipo seja menos patogénico que o HIV-1 [3].

#### 1.4 Replicação Viral

A replicação do HIV-1 envolve as seguintes etapas: adsorção e penetração do vírus na célula hospedeira, transcrição reversa, integração e formação do pró-vírus, transcrição e tradução, montagem, libertação e maturação [6].

A adsorção do vírus à célula hospedeira inicia-se com a ligação da glicoproteína gp120 à glicoproteína CD4 presente na superfície de determinadas células, nomeadamente dos linfócitos T helper ( $T_H$ ), também conhecidos por  $T CD4^+$ . Esta interação promove uma alteração conformacional da gp120 que permite a sua ligação a um co-recetor, nomeadamente ao CCR5 ou ao CXCR4 (co-recetores mais utilizados pelo HIV) [7]. A ligação da gp120 ao recetor CD4 e ao co-recetor desencadeia novamente uma alteração conformacional que expõe o peptídeo de fusão presente na glicoproteína gp41, induzindo assim a fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática da célula hospedeira [3].

Uma vez no citoplasma da célula, ocorre a descapsidação e a exposição do genoma viral, onde a transcriptase reversa vai exercer a função de DNA polimerase RNA dependente, de ribonuclease H e de DNA polimerase DNA dependente, dando origem a uma dupla cadeia de DNA viral (dsDNA) a partir da cadeia simples original de RNA [(+)ssRNA]. A cadeia de dsDNA viral juntamente com algumas proteínas formam o complexo de pré-integração no citoplasma [3].

Contrariamente ao que acontece nos linfócitos  $T CD4^+$  em repouso que ficam em latência pré-integracional, nos linfócitos  $T CD4^+$  ativados o complexo de pré-integração entra no núcleo e o DNA viral é integrado no genoma celular formando o pró-vírus. A integrase (IN) e outras enzimas celulares são as responsáveis por este processo de integração da dupla cadeia de DNA viral (dsDNA) no genoma do hospedeiro [3].

Posteriormente, ocorre a transcrição com a formação de mRNA não só celular, mas agora também viral que ao ser traduzido origina proteínas celulares e percursoros poliproteicos virais. Destes, aqueles codificados pelo gene *env*, por ação de proteases celulares, originam as proteínas necessárias (gp120 e gp41) à montagem do envelope do HIV. Após a

libertação por exocitose das partículas virais não infecciosas da célula-hospedeira ocorre a maturação. Nesta fase, proteases virais codificadas pelo gene *gag+pol* clivam os precursores poliproteicos codificados pelos genes *gag* e *gag+pol* originando a partícula viral infecciosa [3].

De relevar que, como a transcriptase reversa é a única enzima envolvida na transcrição reversa e como, ao contrário de outras DNA polimerases, não tem função de correção de erros (*proofreading*), a probabilidade de ocorrência de mutações é enorme (1 em 1000 nucleótidos por cada ciclo replicativo) [8]. Esta propriedade facilita a formação de quasiespécies com a capacidade de escapar ao sistema imune e de continuar a produzir novos viriões. Para além desta grande variabilidade genética, a latência pós-integracional, um processo pelo qual os linfócitos T CD4<sup>+</sup> previamente ativados entram em repouso e ficam quiescentes na fase de pró-vírus, também acentua o carácter crónico da infeção por HIV.

### 1.5 Transmissão

A transmissão do HIV ocorre por contacto direto com fluídos biológicos infetados. No entanto, a sua transmissão é tanto mais provável quanto maior for a carga viral no fluído biológico, pelo que apesar de se encontrar RNA viral nas lágrimas, na saliva, na urina e no suor das pessoas infetadas com HIV, estes não são fontes de contágio [9]. Ao invés, a transmissão do HIV ocorre na realização de transfusões sanguíneas, partilha de seringas, relações sexuais desprotegidas e durante a gravidez, o parto ou a amamentação [3].

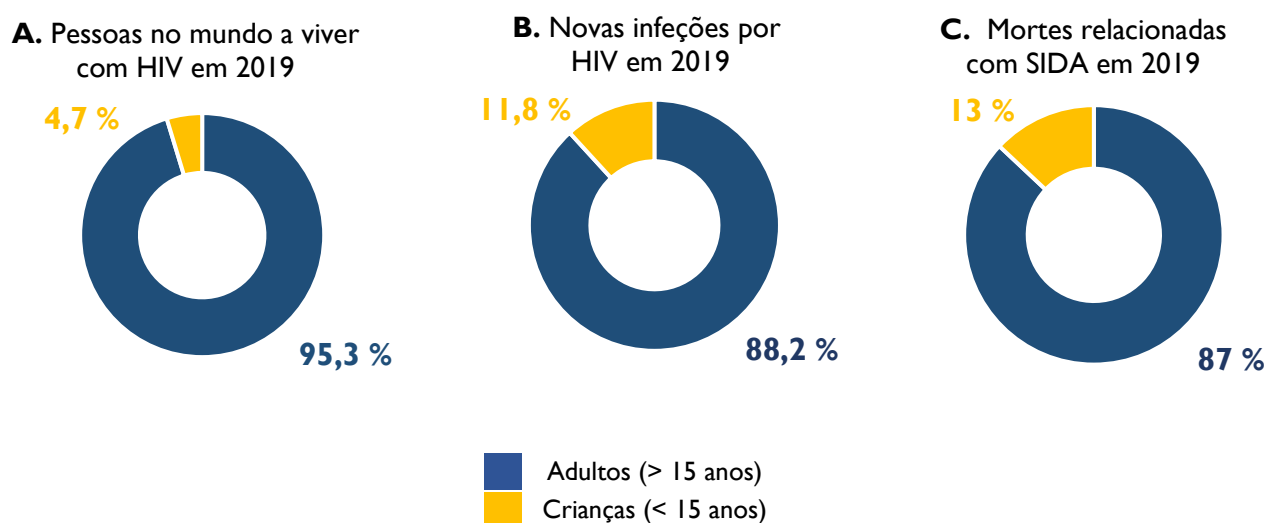
## 2. HIV NO MUNDO

Como demonstrado na Tabela 1, desde 2000 até à atualidade o número de pessoas infetadas pelo HIV tem vindo a aumentar, o que não é necessariamente um sinal negativo, uma vez que este aumento se deve também à crescente cobertura da terapêutica a nível global que aumentou a esperança média de vida daqueles que vivem com HIV.

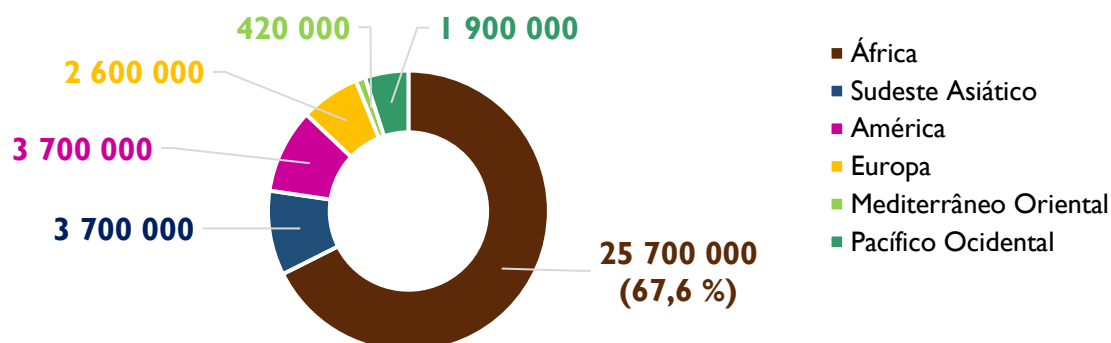
**Tabela 1.** Evolução da infeção por HIV desde 2000 até 2020 no mundo (em milhões) [10].

	2000	2005	2010	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Total infeções por HIV	25.5	28.6	31.1	34.6	35.3	35.9	36.6	37.2	37.7
Novas infeções por HIV	2.9	2.4	2.1	1.8	1.7	1.7	1.6	1.5	1.5
Mortes devidas à SIDA	1.5	1.9	1.3	0.85	0.80	0.75	0.72	0.72	0.68
Indivíduos sob ART	0.56	2.0	7.8	17.1	19.3	21.5	23.1	25.5	27.5

Numa análise identificativa dos grupos populacionais infetados pelo HIV-1, os gráficos 1 e 2 indicam-nos que o HIV afeta sobretudo maiores de 15 anos, residentes nos países em desenvolvimento, nomeadamente no continente Africano.



**Gráfico 1.** Distribuição por idade do número de pessoas no mundo a viver com HIV (A), do número de novas infeções por HIV (B) e do número de mortes relacionadas com SIDA (C) em 2019 [11].



**Gráfico 2.** Distribuição por região do número de pessoas no mundo a viver com HIV em 2019 [12].

## 2.1 Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/SIDA (UNAIDS)

O Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/SIDA (UNAIDS) visa terminar a epidemia de HIV/SIDA até 2030, incluindo-se desta forma num dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável adotados em 2015 por todos os Estados-Membros das Nações Unidas. Este objetivo é visto quantitativamente como uma descida de 90 % tanto no número de novas infeções por HIV como no número de mortes relacionadas com SIDA entre 2010 e 2030 [13].

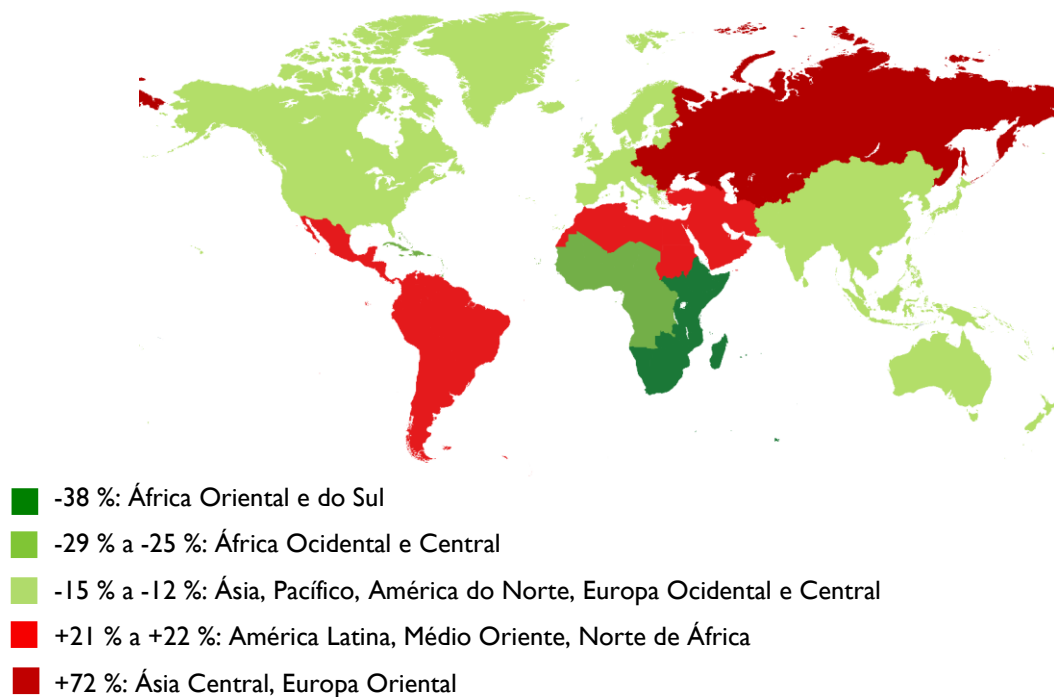
Por outro lado, também em 2014, a UNAIDS estipulou uma meta para 2020 com o projeto 90-90-90: 90 % das pessoas infectadas pelo HIV tenham conhecimento da infecção; 90 % das pessoas diagnosticadas com infecção pelo HIV recebam ART e 90 % dos infectados a receber ART tenham supressão viral, ou seja, estejam com a infecção controlada [13]. Estes objetivos traduzem-se em 33.0 milhões de pessoas infectadas com diagnóstico, 29.7 milhões de pessoas diagnosticadas a receber ART e 26.8 milhões de pessoas a receber ART com supressão viral [14].

Hoje é sabido que todos os esforços que têm vindo a ser feitos para atingir estes objetivos não foram suficientes para cumprir o projeto 90-90-90. Segundo a “*Fact Sheet 2021*”, publicada pela UNAIDS, em 2020, 84 % da população infectada por HIV tinham conhecimento da infecção, 87 % das pessoas diagnosticadas com a infecção por HIV estavam a receber ART e 90 % das pessoas que estavam a receber ART estavam com supressão viral [14].

Alcançar estas metas resultaria numa queda do número de novas infeções pelo HIV e do número de mortes relacionadas com SIDA para menos de 500 000 em 2020, ou seja, uma redução de aproximadamente 75 % em ambos os parâmetros entre 2010 e 2020 [13] [15]. Mas, infelizmente, o progresso na prevenção da transmissão deste retrovírus tem sido insuficiente, uma vez que o número de novas infeções pelo HIV em 2020 (1.5 milhões) representou uma descida de apenas 30 % desde 2010, o que significa que em 2020 o número de novas infeções ainda é três vezes superior ao valor estipulado para atingir em 2020 [10].

Por esse motivo, a UNAIDS publicou recentemente um conjunto de objetivos a cumprir até 2025 para que a meta a que se propôs para 2030 continue a ser alcançável. Assim, surgem agora novos propósitos centrados nas pessoas que vivem com o HIV e nas comunidades de maior risco de infecção por HIV [16].

Apesar de um número considerável de regiões ter mostrado um progresso inspirador, dos quais se destacam a África do Sul e a África Oriental, com uma descida de 38 % entre 2010 e 2019, são mais as regiões que não têm adotado as medidas necessárias à prevenção da infecção por HIV e que, conseqüentemente, sofreram nos últimos anos um aumento do número de novas infeções por HIV, como se pode confirmar na Figura 2 [11].



**Figura 2.** Variação do número de novas infeções por HIV no mundo entre 2010 e 2019 [11].

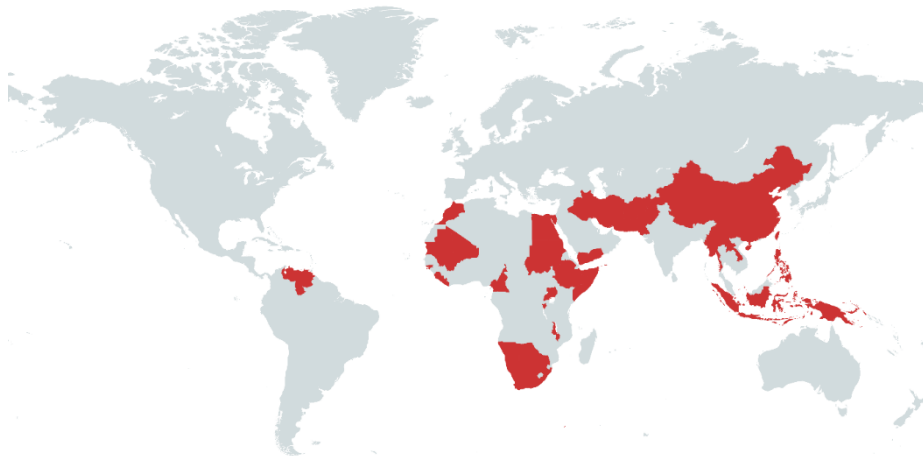
## 2.2 HIV e a pandemia COVID-19

O betacoronavírus SARS-CoV-2 foi descoberto em dezembro de 2019 em Wuhan, capital da província de Hubei, na China, e no dia 11 de março de 2020, foi declarada a pandemia COVID-19 pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Esta velocidade cronológica atestou a necessidade urgente de encontrar uma vacina que conseguisse controlar o número de pessoas infetadas e o número de mortes causadas pelo SARS-CoV-2.

Assim, o conhecimento científico, social e económico conquistado ao longo de 40 anos a responder à epidemia HIV/SIDA tem sido fundamental na resposta à COVID-19. Com os olhos postos nos direitos humanos, a UNAIDS publicou em março de 2020 o documento “*Rights in the time of COVID-19: lessons from HIV for an effective, community-led response*” que sublinha a importância da construção de uma cultura de solidariedade, confiança e entajuda para uma resposta efetiva a esta pandemia [17]. Curiosamente, o primeiro local de tratamento dos doentes infetados com HIV no Camboja (país asiático onde a transmissão por HIV atingiu o recorde de 23 000 novas infeções no ano de 1995) [18], o Hospital da Amizade Khmer-Soviet, é agora usado no apoio aos doentes infetados pelo SARS-CoV-2 [11].

No entanto, e como ilustrado na Figura 3, esta pandemia que em 2020 abalou o mundo foi também motivo para a interrupção na produção e transporte da ART com consequências sobretudo para os países onde a transmissão viral está facilitada devido à inacessibilidade a cuidados básicos de saúde [19]. A título de exemplo, o Relatório “2020 Global AIDS Update -

“*Seizing The Moment*” sublinha o impacto da interrupção do tratamento do HIV referindo que se este se prolongar por seis meses pode resultar em mais de 500 000 mortes adicionais na África Subariana até ao final de 2021.



**Figura 3.** Países onde a pandemia COVID-19 teve impacto negativo na continuidade da ART (dados dos meses de abril, maio e junho de 2020): Venezuela (América); Marrocos, Mauritânia, Mali, Guiné Bissau, Serra Leoa, Libéria, Camarões, Namíbia, Botsuana, África do Sul, Egito, Sudão, Etiópia, Somália, Uganda, Burundi, Malawi (África); Iémen, Iraque, Irão (Médio Oriente); Afeganistão, Paquistão, China, Myanmar, Laos, Indonésia, Filipinas, Taiwan (Ásia); Papua-Nova Guiné (Oceânia) [12].

Para além disso, os infetados pelo HIV que estão imunodeprimidos, que não estão a receber ART, que são idosos, que têm outras comorbilidades associadas ou que vivem em regiões onde as condições sanitárias são precárias, têm um risco superior de testarem positivo à COVID-19 [20].

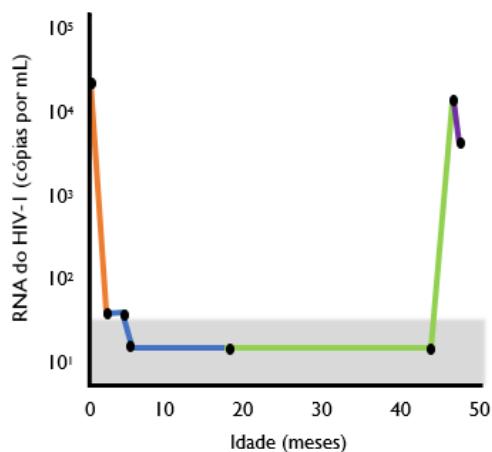
### 3. TERAPÊUTICA

#### 3.1 Terapêutica Antirretroviral

A Terapêutica Antirretroviral (ART) permitiu uma grande evolução na resposta à infeção por HIV, uma vez que, apesar de não curar, tem a capacidade de suprimir a replicação viral e tornar a carga viral indetetável durante um longo período de tempo. Desta forma, a ART trouxe mais tempo e qualidade de vida às pessoas infetadas e reduziu a probabilidade de transmissão do HIV. Em 2020, cerca de 66 % de toda a população infetada com HIV apresentava supressão viral [10].

Apesar da ART não ser curativa quando iniciada num adulto, em determinadas circunstâncias pode ter benefícios adicionais para os bebés de mães infetadas. O caso da bebé de Mississippi veio dar força ao potencial que a ART pode ter se iniciada precocemente. A bebé de Mississippi foi infetada *in utero* e nasceu prematuramente com uma carga viral de

aproximadamente 20 000 cópias de RNA por mL de sangue, tendo iniciado a ART 30 horas após o seu nascimento [21]. Aos 18 meses de vida interrompeu a ART e viveu 30 meses de remissão viral, uma vez que aos 4 anos lhe foi detetada uma carga viral de 16 750 cópias por mL, como representado na Figura 4. Hoje, com 10 anos, a bebé de Mississippi vive com o HIV em virtude da ART que retomou aos 4 anos de vida [22].



**Figura 4.** Cópias de RNA do HIV-1 por mL de sangue da bebé de Mississippi enquanto recebeu zidovudina, lamivudina e nevirapina (laranja); zidovudina, lamivudina e lopinavir potenciado por ritonavir (azul); não recebeu ART (verde); e quando retomou a ART com zidovudina, lamivudina e efavirenz (roxo) [23].

Os fármacos antirretrovirais (Tabela 2) atuam ao nível das três enzimas essenciais à replicação do vírus (TR, IN e P), mas também inibem a entrada do HIV na célula hospedeira atuando ao nível da gp41 (proteína responsável pela fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática da célula hospedeira) ou ao nível do co-recetor CCR5.

**Tabela 2.** Grupos terapêuticos da ART.

Inibidores das Enzimas Virais					
Inibidores da TR			Inibidores da P		Inibidores da IN
Análogos dos Nucleósidos		Não Análogos dos Nucleósidos			
Zidovudina Lamivudina Abacavir Didanosina Entecavir	Emtricitabina Estavudina Adefovir Tenofovir <sup>(1)</sup>	Rilpivirina Efavirenz Nevirapina	Atazanavir <sup>(2)</sup> Darunavir <sup>(2)</sup> Lopinavir <sup>(2)</sup> Tipranavir Indinavir	Fosamprenavir Nelfinavir Tipranavir Saquinavir	Raltegravir Dolutegravir Elvitegravir Bictegravir
Inibidores da Entrada na Célula Hospedeira					
Inibidor da Fusão		Antagonista do Co-recetor CCR5			
Enfuvirtida		Maraviroc <sup>(3)</sup>			

**Legenda:** (1) Tenofovir é um análogo do nucleótido, pelo que já se encontra trifosfatado para ser inserido na cadeia de DNA. (2) Atazanavir, darunavir e lopinavir necessitam da associação com ritonavir, que funciona como potenciador. (3) Antes de iniciar terapêutica com maraviroc é necessário realizar um teste de tropismo viral para averiguar se o vírus utiliza o co-recetor CCR5 para entrar na célula [24].

Devido ao desenvolvimento de resistências num regime de monoterapia, o regime terapêutico atual, que deve ser iniciado o mais cedo possível após diagnóstico da infeção por HIV, associa 3 ou 2 fármacos: dois inibidores da TR e um inibidor da IN (regime preferencial); ou dolutegravir com lamivudina. A escolha do regime terapêutico depende da fase em que se encontra a infeção pelo HIV (infeção primária aguda, fase assintomática ou SIDA), determinada pelo nível de RNA viral e pela contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>; do estado de saúde geral do doente; da presença de co-infeções; e do subtipo viral [24].

Apesar da baixa carga viral se prolongar no tempo com a ART, as pessoas infetadas com HIV são, com a idade, mais suscetíveis de desenvolver doenças cardiovasculares, doença renal crónica e deficiência neurocognitiva. Desta forma, a polimedicação é muito comum nestes doentes, obrigando a uma avaliação da medicação pré-existente ao início da ART, mas também após o diagnóstico de outra condição de saúde que obrigue à administração de medicação concomitantemente à ART. A título de exemplo de potenciais interações, ritonavir (um potenciador de atazanavir, darunavir e lopinavir) é um inibidor da CYP3A4, uma enzima que metaboliza as estatinas e outros fármacos frequentemente utilizados pela população [24].



### **3.1.1 Regimes de Profilaxia Pré-Exposição**

A Profilaxia Pré-Exposição (PrEP) destina-se àqueles que estando seronegativos para o HIV, têm o risco de vir a ser infectados, tendo como objetivo prevenir e reduzir a incidência da infecção por HIV [25]. Assim, o regime de PrEP inclui os inibidores da TR tenofovir disoproxil fumarato e emtricitabina e deve ser iniciado assim que possível por quem tem comportamentos de risco, com avaliação ao fim de quatro semanas e, posteriormente, a cada trimestre [24].

### **3.1.2 Regimes de Profilaxia Pós-Exposição**

Por outro lado, em situações de emergência em que houve previamente um comportamento de risco surge o conceito de Profilaxia Pós-Exposição (PEP), que reduz em 80 a 90 % a probabilidade de infecção por HIV. Neste caso é recomendado um regime que combina três fármacos e que deve ser iniciado até 72 horas (idealmente até 24 horas) após a exposição e continuado durante 28 dias [24].

## **3.2 Shock and Kill**

O HIV-1 tem uma particularidade que o torna capaz de escapar não só ao sistema imune como também às terapias desenvolvidas até hoje: o estabelecimento de reservatório. Este reservatório, caracterizado pela sua notável estabilidade, inclui linfócitos T CD4<sup>+</sup> em repouso, monócitos, macrófagos, células dendríticas, células progenitoras hematopoiéticas e células da microglia onde o HIV-1 consegue permanecer de forma latente [26]. Assim, com o propósito de eliminar a infecção pelo HIV-1 surgiram abordagens cujo objetivo é atingir o reservatório.

A abordagem *shock and kill*, também designada por *kick and kill*, consiste na reativação do vírus do reservatório, com consequente produção de RNA ou de proteínas virais, para que o sistema imune reconheça e elimine as células infectadas através duma resposta mediada por anticorpos ou por linfócitos T citotóxicos [26]. Para isso foram desenvolvidos Agentes de Reversão de Latência (LRAs), que se dividem em três grupos: (1) inibidores da Histona Deacetilase (HDACi), (2) inibidores da Histona H3K9 Metiltransferase (HMTi) e (3) inibidores BET. Dos três grupos, apenas os HDACi se encontram em ensaios clínicos. Para além destes também têm vindo a ser estudadas outras estratégias mais seguras para reversão da latência, nomeadamente ativadores do Fator Nuclear- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) e da proteína quinase C [27].

Contudo, mesmo depois de uma etapa *kick* bem-sucedida, um estudo realizado por Alba Ruiz e Oscar Blanch-Lombarte, da Universidade Autónoma de Barcelona, verificou que

o sistema imune dos doentes infetados pelo HIV sujeitos à ART não é capaz de remover todas as células infetadas [28]. Por isso, a solução pode passar pela transfusão autóloga de células T CD8<sup>+</sup> previamente modificadas para que estas sejam dirigidas especificamente para as células infetadas pelo HIV [26].

Alternativamente, e uma vez que parece ser insuficiente para eliminar completamente o reservatório, a estratégia *shock and kill* pode ser utilizada como complemento a outras abordagens. Por exemplo, pode vir a ser utilizada para reduzir o tamanho do reservatório para que posteriormente a imunoterapia possa ser aplicada de forma mais eficaz [21].

### **3.3 Block and Lock**

Enquanto a estratégia *shock and kill* é o foco de estudos que ambicionam a cura esterilizante, i.e. a total ausência de vírus, a estratégia *block and lock* apenas tem como objetivo a cura funcional, i.e. a remissão clínica sustentada do HIV na ausência de ART. O objetivo desta estratégia é silenciar de forma permanente o reservatório viral recorrendo a Agentes Promotores de Latência (LPAs) capazes de bloquear a transcrição do vírus através de modificações epigenéticas. Ou seja, a estratégia *block and lock* mimetiza o mecanismo natural de latência do HIV, razão pela qual se diz induzir um estado de “*deep latency*” ou de “*super latency*”. Um dos desafios que se coloca é o desenvolvimento de sistemas de *delivery* direcionados para o reservatório [29].

São várias as moléculas que têm vindo a ser estudadas no âmbito desta estratégia, entre elas a *didehydro-Cortistatin A* (dCA). A dCA é um análogo do produto natural Cortistatin A, um inibidor específico da proteína Tat. Dado que a proteína Tat é expressa precocemente na infeção por HIV, tem uma conservação transversal a todas as estirpes de HIV-1, não tem homólogos celulares e dado que a sua inibição evita a transcrição e a produção exponencial de novos virões, a dCA demonstrou ser um LPA que conduz a um estado de latência tal que é refratário à reativação por LRAs [30].

A combinação das estratégias *shock and kill* e *block and lock* tem um forte potencial no desenvolvimento de uma terapêutica anti-HIV: a primeira permite a redução do tamanho do reservatório viral, ao passo que a segunda silencia as restantes células com o pro-vírus [30].

### 3.4 Terapia Molecular

Apesar do sucesso da ART, esta também apresenta desvantagens significativas. O regime terapêutico ótimo na infecção por HIV é aquele que resulta numa elevada supressão viral, não apresenta toxicidade, é de toma única e não apresenta interações medicamentosas [24]. Desta forma, dado que a ART é uma terapêutica crónica não curativa, com altos custos associados e com alguma toxicidade, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o HIV capazes de alcançar todos aqueles que dela precisam é uma necessidade global [24] [31].

#### 3.4.1 Terapia Génica Pré-Transcrição

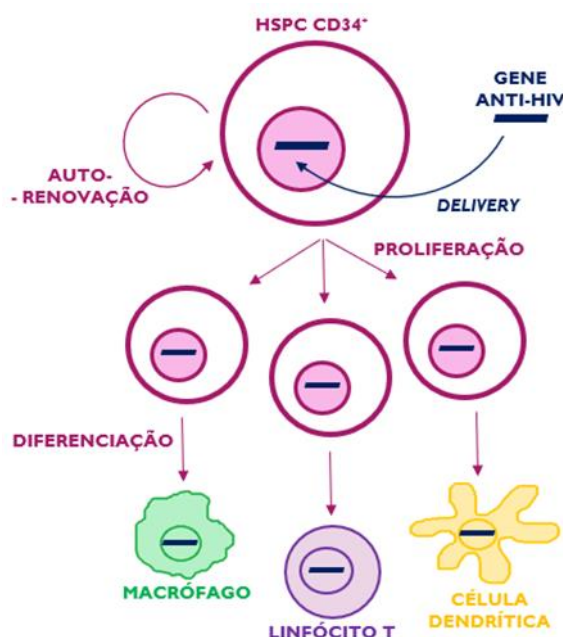
##### 3.4.1.1 Transplante de células estaminais hematopoiéticas com mutação CCR5 $\Delta$ 32

O primeiro caso de cura do HIV, no qual o HIV se tornou indetetável e a contagem de células T CD4<sup>+</sup> normalizou, decorreu de um transplante alogénico de medula óssea necessário ao tratamento do senhor Timothy Ray Brown (conhecido por doente de Berlim) que, para além de estar infetado com o HIV, tinha sido diagnosticado com Leucemia Mielóide Aguda [32]. O transplante de células estaminais que recebeu permitiu a reconstituição total do seu sistema imune com células resistentes ao HIV [31], uma vez que o dador era homocigótico para a variante  $\Delta$ 32 do gene *CCR5* (gene que codifica o co-recetor CCR5, presente nas células T CD4<sup>+</sup> e fundamental à entrada do HIV na célula) - CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 [33]. A mutação  $\Delta$ 32 neste gene impede a expressão do co-recetor CCR5 à superfície da célula e, conseqüentemente, confere resistência à infecção pelo HIV com tropismo para o CCR5 (também designado por vírus R5) [33].

Mais recentemente, em março de 2020, o senhor Adam Castillejo (conhecido por doente de Londres) foi anunciado como o segundo caso de cura do HIV [34]. Após ter interrompido a ART e ser submetido a um transplante de células estaminais hematopoiéticas CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 para tratamento do linfoma de Hodgkin, tem-se mantido a remissão do HIV [35].

Estes dois casos de sucesso despoletaram o estudo de estratégias terapêuticas baseadas na engenharia genética de Células Estaminais Progenitoras Hematopoiéticas (HSPC) para que estas se tornem resistentes ao HIV. A Figura 5 ilustra a capacidade desta estratégia promissora no desenvolvimento de uma terapia anti-HIV baseada na capacidade de auto-

renovação, proliferação e diferenciação contínua das HSPC nas células do sistema imune maduras, incluindo linfócitos T, macrófagos e células dendríticas [31].



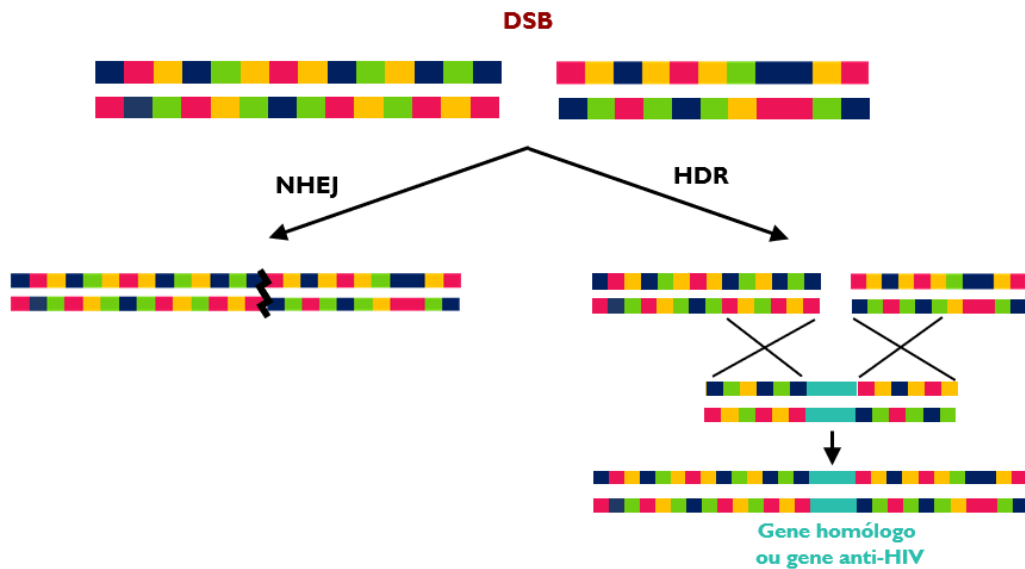
**Figura 5.** Engenharia genética das HSPC CD34<sup>+</sup> para resistir à infecção pelo HIV [31].

### 3.4.1.2 Nucleases

Uma das abordagens em estudo envolve a inativação do genoma viral integrado (ou seja, do genoma pró-viral) recorrendo a nucleases, nomeadamente às Nucleases *Zinc Finger* (ZFN), às Nucleases *Transcription Activator-Like Effector* (TALEN) ou à CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Estas nucleases destroem o DNA e podem impedir a expressão de determinados genes, como o *CCR5*, ou podem permitir que ocorra recombinação homóloga com consequente inserção de um gene anti-HIV. No entanto, dada a sua natureza, esta estratégia tem também o forte potencial para mutações *off-target* [36].

#### i) Nucleases *Zinc Finger*

As ZFN são enzimas de restrição sintéticas constituídas por dois domínios: o *DNA binding domain* (específico) e o *DNA cleavage domain* (endonuclease de restrição não específica) [33]. Após o reconhecimento e ligação das ZFN, ocorre a clivagem da dupla cadeia de DNA (*Double-Stranded Break*, DSB), que tanto pode ser reparada pelo sistema *Non-Homologous End Joining* (NHEJ) como por Reparação Homóloga Dirigida (HDR), como representado na Figura 6 [8].

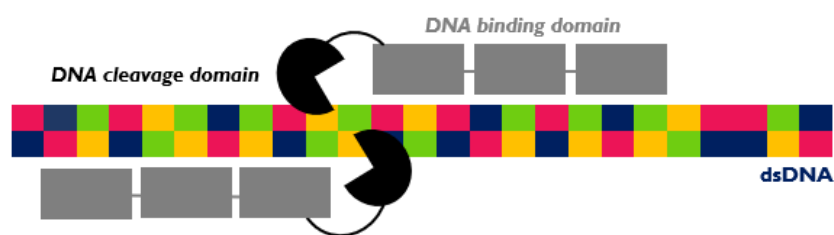


**Figura 6.** Mecanismos de reparação da clivagem na dupla cadeia de DNA (DSB): *Non Homologous End Joining* (NHEJ) ou *Reparação Homóloga Dirigida* (HDR) [37].

O *knock out* do gene *CCR5* é, assim, uma das aplicações das ZFN. Estas podem provocar a disrupção bialélica deste gene, eliminando por completo a expressão do co-recetor *CCR5* à superfície da célula, ou disrupção monoalélica, apenas reduzindo a densidade do co-recetor [33]. São já três os estudos com resultados promissores (NCT008426634, NCT01044654 e NCT01252641). O processo envolve a remoção de células T CD4<sup>+</sup> ou HSPC de doentes infetados com HIV-1, a modificação genética pelas ZFN com conseqüente mutação do gene *CCR5* e posterior reintrodução das células agora resistentes ao vírus [8].

Estudos mais recentes demonstram ainda que, recorrendo às ZFN, é possível inserir um transgene no gene *CCR5* e, dessa forma, alcançar um duplo efeito: o *knock out* do gene *CCR5* e o *knock in* de um gene de interesse anti-HIV [31].

Numa tentativa de melhorar a especificidade das ZFN, ilustradas na Figura 7, tem sido estudada uma alternativa mais refinada, que se designa por *Zinc-Finger Nickases* (ZFNickases), e que tem a vantagem de estimular a HDR em detrimento do sistema de reparação NHEJ, mais propenso a erros [38].



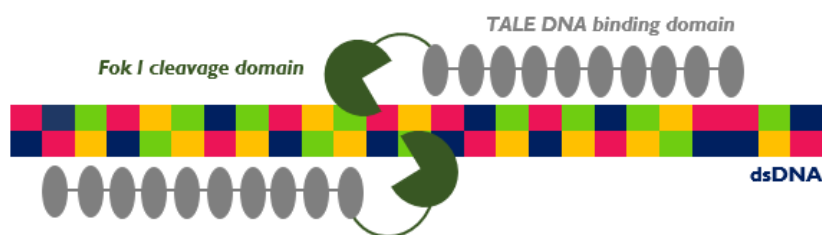
**Figura 7.** Nuclease *Zinc Finger* [8].

## ii) TALEN

As TALEN representadas na Figura 8, são uma segunda geração de nucleases, estruturalmente semelhantes às ZFN pois também são constituídas por dois domínios: o *TALE DNA binding domain* e o *Fok I cleavage domain* (endonuclease) [39]. Tal como as ZFN, as TALEN levam à formação de DSBs em sequências específicas do genoma [31].

A especificidade do domínio *TALE* depende de dois aminoácidos hipervariáveis designados por *Repeat-Variable Diresidues* (RVDs). Uma vez que as TALEN reconhecem sequências de 33 a 35 pares de bases (bp) (cada aminoácido da proteína *TALE* reconhece 1 bp), estas têm maior especificidade que as ZFN [38], que reconhecem sequências de apenas 9 a 18 bp (cada “dedo” reconhece 3 bp) [8].

Apesar de ainda não terem chegado à fase de ensaios clínicos para o tratamento da infeção por HIV-1, as TALEN têm tido resultados promissores e com potencial de otimização para uma futura aplicação em larga escala [8]. Um alvo possível é, para além do co-recetor celular CCR5, a proteína viral da matriz (p17), que tem a vantagem de ter uma sequência com baixa diversidade.



**Figura 8.** Nuclease *Transcription Activator-Like Effector* [8].

## iii) CRISPR-Cas9

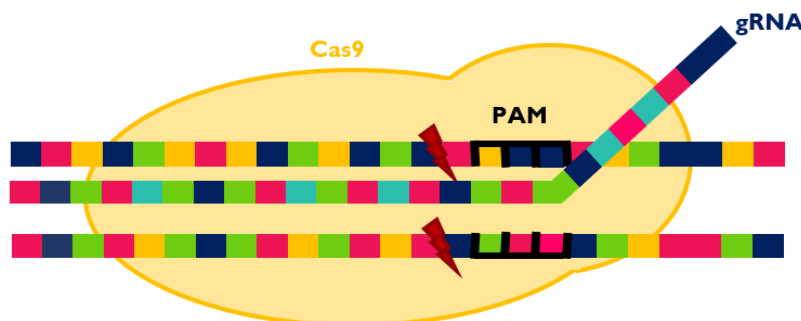
A identificação do sistema imune CRISPR-Cas nas bactérias e posterior transformação para aplicação do sistema CRISPR-Cas9 como terapia no Homem foi uma descoberta que veio revolucionar o panorama terapêutico da infeção por HIV-1. Não só devido ao seu design e precisão, mas também à sua relação custo-eficácia e simplicidade, CRISPR-Cas9 é uma estratégia de manipulação genética com grande especificidade e com um futuro promissor [8].

Contrariamente às primeiras nucleases, ZFN e TALEN, a CRISPR-Cas9 utiliza um RNA guia (gRNA) específico (com cerca de 20 nucleótidos) que direciona a nuclease (Cas9) para uma região PAM (*Protospacer Adjacent Motif*, um conjunto de três nucleótidos altamente conservados imediatamente a jusante do local de corte) e determina o local da modificação genética. Posteriormente, e tal como as nucleases anteriormente referidas, a reparação do

DNA pode ser feita tanto pelo sistema NHEJ como por HDR [8]. A introdução de *indels* (inserção ou deleção de bases) no sistema NHEJ de reparação do genoma do HIV já demonstrou que tanto pode ter efeito terapêutico como também pode contribuir para o aumento da virulência do vírus [40]. O mecanismo simplificado da CRISPR-Cas9 está representado na Figura 9.

Apesar de não estarem a decorrer atualmente ensaios clínicos com a CRISPR-Cas9, desde a sua descoberta que esta estratégia tem vindo a ser extensamente estudada para *knock out* do gene *CCR5* [31]. Um exemplo são os ensaios pré-clínicos a serem desenvolvidos por Wang e a sua equipa, que utilizam lentivírus como vetores para expressar o *CCR5*-sgRNA (cadeia simples de RNA guia cujo alvo é o gene *CCR5*) e a enzima Cas9, conferindo resistência das células T CD4<sup>+</sup> à infeção pelo HIV-1 [8].

No entanto, a CRISPR-Cas9 também tem sido estudada para outros fins. Uma das aplicações mais recentes visa remover todo o genoma integrado do HIV-1 (pro-vírus), através dos LTRs (*Long Terminal Repeats*) localizados nas extremidades 5' e 3' do DNA das células T CD4<sup>+</sup> infetadas de forma latente. Por outro lado, a CRISPR-Cas9 tem também vindo a ser utilizada com sucesso na ativação de células infetadas de forma latente, para promover a sua deteção pelas células do sistema imune [8].



**Figura 9.** Mecanismo da CRISPR-Cas9. O gRNA reconhece a região PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) e a enzima Cas9 atua originando uma DSB que é posteriormente reparada pelo sistema NHEJ, mais propenso a erros, ou por HDR quando na presença de uma cadeia molde [40].

Uma análise comparativa das três nucleases indica que as TALEN parecem ter menor toxicidade e menor potencial para mutações *off-target* que as ZFN e a CRISPR-Cas9, uma vez que reconhecem cadeias mais compridas de nucleótidos [33]. No entanto, as ZFN e as TALEN requerem mais tempo despendido no design, na concretização e na otimização, comparativamente à CRISPR-Cas9, fazendo desta última a estratégia de edição génica mais fácil e mais barata para os países onde o HIV-1 é endémico [39].

#### iv) *Natronobacterium gregoryi Argonaute*

Mais recentemente, a *Natronobacterium gregoryi Argonaute* (NgAgo) tem vindo também a ser estudada como uma estratégia de edição génica das células humanas infetadas pelo HIV [8]. A NgAgo é uma endonuclease *DNA-guided* que, em oposição à Cas9, não necessita da região PAM para se ligar à sequência alvo e que é especialmente eficiente na edição de alvos genómicos ricos no par guanina-citosina (G+C) [41].

#### 3.4.1.2.1 Dificuldades de implementação das nucleases

O sucesso da utilização das nucleases no combate à infeção por HIV tem duas importantes barreiras: a etapa de *delivery* e o escape do vírus. Para o avanço desta estratégia de edição génica é necessário que o sistema de *delivery*, através de nanopartículas ou de vetores biológicos, seja preciso no alcance das células alvo e seja tolerado pelo sistema imune. Os adenovírus e os lentivírus são os dois principais sistemas de *delivery* de nucleases [8].

Por outro lado, a resistência do vírus às nucleases é também um desafio. A resistência do HIV às nucleases pode resultar, por exemplo, da introdução de mutações por reparação errónea pelo sistema NHEJ que permitem a replicação viral e impedem a ligação e a ação das nucleases. Assim, paralelamente, têm de ser desenvolvidas estratégias que combatam a resistência viral, como é exemplo a combinação da ART com a CRISPR-Cas9 [8].

#### 3.4.2 Terapia Génica Pós-Transcrição

##### 3.4.2.1 Ribozimas

Uma das abordagens terapêuticas que tem sido estudada na tentativa de chegar à cura da infeção por HIV é a utilização de ribozimas. Para além de estarem entre as primeiras estratégias de terapia génica a chegar à fase de ensaios clínicos, continuam a ser potenciais candidatas para aplicação terapêutica na infeção pelo HIV [42].

As ribozimas são moléculas catalíticas de RNA que funcionam como enzimas e atuam numa fase pós-transcrição [31]. Estas moléculas são específicas para determinadas sequências do genoma viral e podem ser utilizadas de forma combinada, evitando assim a resistência viral [43]. Quando o alvo é o HIV, dentro das mais comumente utilizadas estão as ribozimas “*hammerhead*” e “*hairpin*”, que pertencem ao grupo “*small self-cleaving ribozymes*” [42].

O primeiro alvo a ser explorado no *design* de ribozimas anti-HIV foi a sequência de RNA que codifica para a poliproteína Gag. No entanto, as primeiras a chegarem à fase de ensaios clínicos foram duas ribozimas “*hairpin*” dirigidas para a região não traduzida na



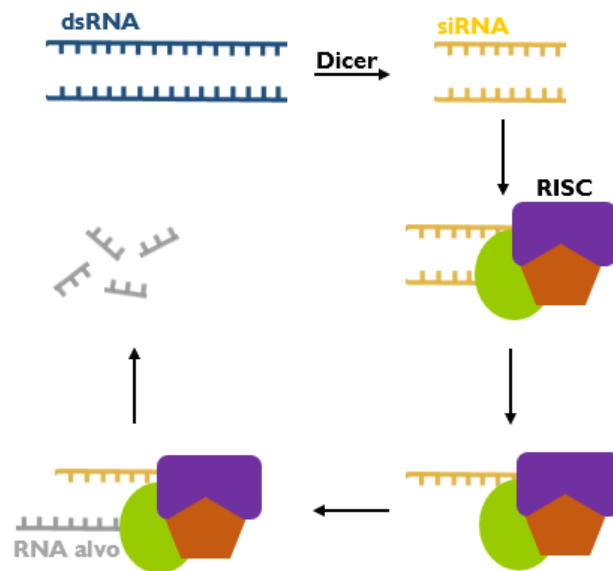
extremidade 5' (UTR) e para a sequência de RNA do HIV que codifica para a poliproteína Pol. Entre outros alvos das ribozimas anti-HIV estão o gene *env*, e os genes que codificam para a proteína acessória Vpr e para as proteínas reguladoras Tat e Rev [42].

Outro alvo em estudo é o mRNA do co-recetor CCR5, com o objetivo de impedir a sua tradução e expressão à superfície da célula alvo. As primeiras ribozimas a serem desenhadas neste sentido são do tipo “*hammerhead*” e a sua ação de clivagem ocorre *upstream* às posições 77 e 359 do gene que codifica para o CCR5 [42]. Mais recentemente, a ribozima que atua na posição 77 deste gene foi combinada com duas outras moléculas anti-HIV: a molécula de shRNA (*short hairpin RNA*), cujo alvo é o gene *tat*, e a molécula TAR (*Trans-Activation Response element decoy*) [31]. Enquanto a molécula de shRNA vai ter uma ação de degradação do mRNA viral, como descrito na secção seguinte, a molécula TAR *decoy* vai ligar e sequestrar a proteína Tat e impedir assim a sua interação com o segmento de mRNA TAR [31], que se localiza na extremidade 5' de todos os transcritos virais do HIV e que funciona como interruptor para início da replicação viral [44]. Dado que a interação Tat/TAR é fundamental para a replicação do HIV o seu bloqueio impede a transmissão do vírus a outras células [45]. Recorrendo a um lentivírus como vetor, esta estratégia que combina três moléculas foi avaliada em ensaios clínicos de fase I/II [46].

#### **3.4.2.2 RNA interference**

Uma das abordagens que também tem sido estudada na procura de uma cura funcional (na qual há replicação controlada do HIV-1 na ausência de terapia farmacológica) é o mecanismo de RNA *interference* (RNAi) [47].

A maioria das células eucariotas consegue utilizar o processo de RNAi como mecanismo de defesa contra agentes patogénicos, como demonstrado na Figura 10. A Dicer (RNase) processa regiões de RNA em dupla cadeia (dsRNA) do agente patogénico, em *small interfering RNAs* (siRNAs) com 21 a 23 bp [8]. Posteriormente, estes siRNAs são conjugados com um conjunto de proteínas celulares formando o complexo RNA-*Induced Silencing Complex* (RISC), que cliva a sequência de RNA invasora, da qual a molécula de siRNA deriva [47].



**Figura 10.** Processo de RNAi como mecanismo de defesa [48].

A nível terapêutico, os siRNAs podem ser utilizados para diminuir a expressão de uma determinada proteína necessária à infecção pelo HIV. Os vírus adeno-associados (AAV) e os retrovírus são potenciais candidatos para o *delivery* destas moléculas a células sem capacidade de divisão e a células com capacidade de divisão, respetivamente. A molécula de siRNA pode ainda ser entregue à célula indiretamente através de um vetor viral que expresse continuamente *short hairpin RNAs* (shRNAs), que posteriormente são convertidos pela Dicer em siRNAs na célula alvo [47].

Os shRNAs podem ter como alvo genes humanos ou o mRNA do HIV-1. No primeiro caso, o alvo serão genes indispensáveis para a replicação do vírus, como são o *CCR5*, o *TRBP*, o *ALIX* e o *AGT6*. A vantagem de direcionar a terapêutica para o mRNA de proteínas celulares envolvidas na replicação do HIV-1 é a menor probabilidade de desenvolvimento de resistência pelo vírus. No entanto, ao interferir com genes celulares existe um risco aumentado de efeitos adversos inesperados [47].

Por outro lado, os shRNAs podem atuar ao nível do RNA viral, como é exemplo o shRNA que atua no exão I sobreposto *tat/rev* (estudo clínico NCT01961063). No desenvolvimento destas moléculas terapêuticas devem ser preferidas as sequências alvo conservadas ao longo das várias estirpes do HIV-1 para que, dessa forma, seja possível obter uma ação terapêutica seja qual for a estirpe presente no doente infetado. Para além disso, e uma vez que o HIV-1 tem mecanismos que lhe permitem resistir a estas moléculas, deve ser tida em consideração não só a conservação da sequência alvo como também a estrutura do RNA. Mutações fora da sequência alvo podem resultar em alterações estruturais que impedem o shRNA de se ligar, anulando assim o seu potencial efeito terapêutico [47].

Um exemplo de um shRNA dirigido ao RNA viral é o sh1005 [31], que tem como alvo o CCR5. O transplante de células HSPC CD34<sup>+</sup> modificadas com um vetor lentiviral que expressa o sh1005 irá permitir a produção contínua de linfócitos T CD4<sup>+</sup> com uma expressão diminuída do co-recetor CCR5 à superfície [49]. Mais recentemente, esta molécula sh1005 tem vindo a ser estudada em combinação com um segundo shRNA, cujo alvo é o LTR do HIV-1, e alternativamente em combinação com um inibidor da fusão do HIV-1, o peptídeo C46, permitindo a inibição conjunta dos vírus com tropismo para o CCR5 e para o CXCR4 [31].

Apesar do potencial da terapêutica anti-HIV à base do RNAi, existem barreiras de particular importância, nomeadamente o desenvolvimento de “siRNA *escape mutants*” em resultado da elevada taxa de erro da transcriptase reversa. Deste modo, a solução passa pela combinação de múltiplos siRNA anti-HIV, ou pela combinação do RNAi com outra terapêutica, como a ART [8].

Outro desafio que se coloca aquando da utilização de siRNAs é a dificuldade de penetração da membrana celular, uma vez que estas moléculas são carregadas negativamente e têm elevado peso molecular. Por outro lado, os siRNA são suscetíveis de degradação por RNases. Assim, métodos de *delivery* que envolvem a nanotecnologia e a transfecção hidrodinâmica de células, bem como a utilização de plasmídeos e lentivírus como vetores, têm sido muito úteis no estudo destas moléculas [8].

Para que tenham vantagem competitiva sobre as restantes terapêuticas anti-HIV-1, os siRNAs terão que manter a sua atividade durante um longo período de tempo, ser administrados oralmente, e alcançar, com uma única toma diária, carga viral indetetável [47].

### **3.4.3 Imunoterapia**

Tendo como base o modelo de cura funcional dos *elite controllers* (pessoas infetadas com HIV-1 com a capacidade de controlar a replicação viral na ausência de ART) [50], uma das estratégias em estudo na luta contra a infeção pelo HIV é a imunoterapia. Ou seja, é o direcionamento da resposta imune para as células infetadas em estado de latência [51].

#### **3.4.3.1 Vacinas**

A vacinação é uma das abordagens em estudo da imunoterapia que visa aumentar a resposta imune anti-HIV de modo a melhorar a eliminação das células infetadas pelo HIV [27]. São inúmeras as vacinas terapêuticas em estudo, incluindo vacinas de vírus vivos atenuados, vacinas de vírus inativados, vacinas de subunidade, vacinas de ácidos nucleicos (DNA ou

mRNA), vacinas de vetores recombinantes, vacinas de péptidos sintéticos, vacinas das mucosas, vacinas de *prime-boost* e vacinas em mosaico.

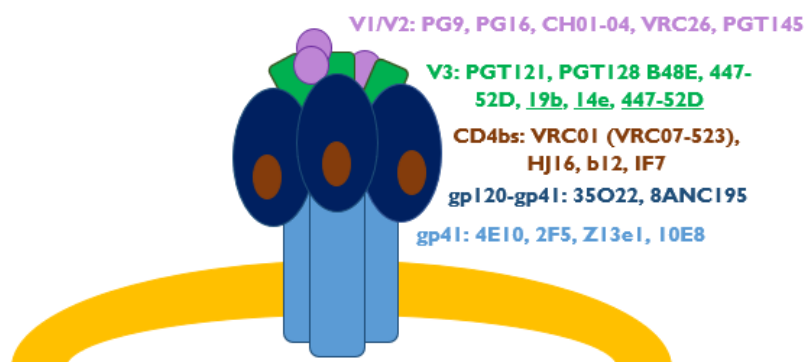
Para além das vacinas terapêuticas, também se encontram em estudo vacinas preventivas. No entanto, o ensaio clínico RVI44, baseado num *prime-boost* de gp120 e realizado na Tailândia, foi o único, até hoje, a demonstrar alguma eficácia na proteção contra o HIV-1 [52].

A dificuldade no desenvolvimento de uma vacina eficaz deve-se à diversidade na sequência genética devido à atividade errónea da transcriptase reversa; ao tempo necessário ao desenvolvimento de anticorpos neutralizantes (bnAbs) após a infeção; à dificuldade de ligação dos bnAbs devido ao “*glycan shield*” presente à superfície do envelope do HIV; à possibilidade de ligação dos bnAbs a proteínas do hospedeiro e ao facto de se tratar de um retrovírus que se integra rapidamente no genoma humano estabelecendo reservatórios de difícil acesso [52].

### 3.4.3.2 Transferência passiva de anticorpos

Uma segunda abordagem da imunoterapia passa pela transferência passiva de bnAbs. Ao contrário das vacinas preventivas, que procuram estimular o sistema imune de indivíduos não infetados a produzir anticorpos, a transferência passiva de anticorpos envolve a entrega direta de bnAbs ao indivíduo infetado através de injeções ou infusões IV [53].

Como evidencia a Figura 11, estes anticorpos podem ser dirigidos a vários alvos presentes no envelope do vírus: à região de ligação à molécula CD4 na gp120 (CD4bs), à região VI/V2 (primeiro e segundo domínios variáveis da proteína gp120), à região V3 (terceiro domínio variável da proteína gp120), à Região Proximal Externa da Membrana (MPER) presente na gp41, à região contígua gp120-gp41 ou mesmo ao “*glycan shield*” [54].



**Figura 11.** Alvos presentes no envelope do HIV-1 e anticorpos bnAbs e NnAbs que a eles se ligam [26].

A título de exemplo, o bnAb VRC01 atua na região de ligação à molécula CD4 na glicoproteína gp120 e foi um dos primeiros anticorpos a apresentar resultados promissores. Entretanto, com o objetivo de aumentar o seu tempo de ação e a sua afinidade para o recetor Fc das células do sistema imune, a região constante da cadeia pesada deste anticorpo já foi sujeita a mutações, dando origem à forma alterada VRC01-LS que pode, desta forma, ser administrada menos frequentemente que a forma VRC01 [55].

Apesar dos bnAbs serem capazes de se ligar e neutralizar as partículas virais, os anticorpos não neutralizantes (NnAbs) também parecem desempenhar uma importante ação inibitória sobre o mecanismo replicativo do HIV-1. Tal foi demonstrado na fase III do ensaio clínico RV144, no qual se verificou que o reduzido risco de infeção por HIV das pessoas vacinadas estava relacionado não com bnAbs mas sim com NnAbs anti-V1/V2 [56].

A fim de evitar o desenvolvimento de resistência pelo HIV e aumentar a potência e a amplitude de resposta, tem vindo a ser estudada a possibilidade de combinar diferentes bnAbs com alvos distintos, mas também a possibilidade de ter bnAbs bi ou tri-específicos. Com um anticorpo bi-específico poder-se-á ter como alvos, simultaneamente, um antigénio do HIV-1 e um recetor de uma célula T do sistema imune, potenciando, assim, a resposta imune anti-HIV mediada por anticorpos [57].

#### **3.4.3.3 Transferência indireta de anticorpos**

A implementação a nível global de bnAbs como estratégia de imunoterapia passiva é bastante desafiante tanto pelo custo de produção que lhe está associado, como também pela infraestrutura necessária à sua administração repetida por infusão. Por este motivo, tem-se considerado a hipótese de transferir indiretamente os bnAbs para o hospedeiro através de vetores virais, onde os vírus adeno-associados (AAV) apresentam um importante papel no *delivery* dos genes que codificam para os bnAbs [54]. Os AAV não são patogénicos, têm a capacidade de integrar o genoma humano permitindo a produção de anticorpos por longos períodos de tempo e conseguem infetar tanto células quiescentes como células em divisão [55].

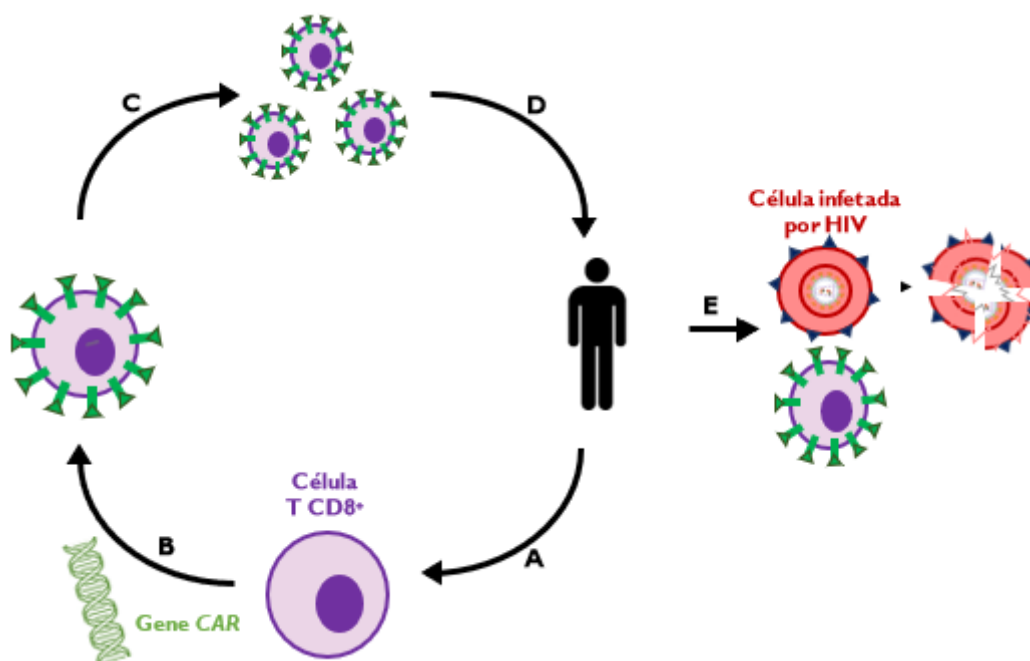
#### **3.4.3.4 Anticorpos monoclonais**

Por outro lado, no contexto da imunoterapia há também a possibilidade de usar anticorpos monoclonais (mAbs) do tipo IgG, como o Ibalizumab e o PRO 140, capazes de inibir a entrada do vírus na célula alvo. Enquanto o Ibalizumab é um anticorpo humanizado capaz de se ligar à molécula CD4, o PRO 140 é um anticorpo humanizado que se liga ao co-

recetor CCR5, inibindo a entrada na célula dos vírus R5. Estes anticorpos têm como desvantagem a necessidade de administração intramuscular a cada 1-2 semanas e a necessidade de garantir que o vírus utiliza o CCR5, respetivamente [57].

### 3.4.3.5 Células T CAR

Uma última abordagem da imunoterapia (ilustrada na Figura 12) envolve os Recetores Quiméricos de Antígeno (CARs) das células T CD8<sup>+</sup> [51]. O recetor CAR contém três domínios: um domínio extracelular (*single chain Fragment variant*, scFv) que se liga especificamente ao antígeno, uma porção transmembranar que ancora o recetor e um domínio intracelular (*endodomain*) para transferência do sinal. Após recolha e modificação *in vitro* das células T CD8<sup>+</sup> com CARs específicos para o HIV, estas são re-introduzidas no doente com o objetivo de reconhecerem as células infetadas pelo HIV e, conseqüentemente, provocarem a sua morte [58].



**Figura 12.** Terapia com células T CAR na infecção por HIV. Recolha das células T CD8<sup>+</sup> do doente infetado por HIV (A), manipulação *in vitro* para inserção do gene CAR nas células T CD8<sup>+</sup> (B), expansão das células T CAR (C), re-infusão das células T CAR específicas para o HIV no indivíduo infetado por HIV (D), e morte das células infetadas pelo HIV pelas células T CAR (E) [58].

Atualmente existem quatro gerações de CARs. A primeira geração tem apenas a estrutura de sinalização CD3 $\zeta$ . A segunda e a terceira gerações têm adicionalmente moléculas co-estimulatórias, de modo a promover a proliferação, a persistência e a citotoxicidade das células T. Na última geração de células T CAR, também conhecidas por TRUCK (*T cell Redirected for Universal Cytokine-mediated Killing*), a expressão do CAR é acompanhada pela

libertação da citocina interleucina 12 (IL-12), potenciando a ativação das células do sistema imune inato [58].

As células T CD8<sup>+</sup> são um alvo comum de estudos com células T CAR, uma vez que o controlo da replicação viral nos *elite controllers* é mediado extensamente por uma resposta de células T CD8<sup>+</sup>. Para além disso, como estas células não têm a molécula CD4, não são vulneráveis à infeção pelo HIV e, sendo células T, sobrevivem por longos períodos de tempo [58].

No entanto, têm ainda vindo a ser investigadas outros grupos de células, nomeadamente as células *Natural Killer* (NK). Tal como as células T, as células NK modificadas com o CAR são capazes de promover a sinalização através da molécula CD3ζ após a ligação do domínio scFv a um antígeno específico. Para além disso, as células NK são promissoras porque, contrariamente às células T, apresentam menos efeitos adversos graves que as células T, existem em número suficiente no sangue periférico e não parecem ser infetadas pelo HIV [59].

Mais recentemente, a utilização de HSPC modificadas com o CAR tem também sido alvo de investigação. Estas células ao diferenciarem dão origem a células NK resistentes ao HIV e que suprimem a replicação do vírus. Adicionalmente, esta abordagem garante a produção contínua de células NK, conferindo vantagem face à utilização direta de células NK provenientes do sangue periférico do doente [59].

### **3.5 Combinação de terapias**

Um dos obstáculos ao desenvolvimento de uma terapêutica anti-HIV é atribuído à capacidade exímia que o HIV tem de desenvolver mecanismos de resistência às mais variadas terapêuticas. Assim, e como acontece na terapêutica antirretroviral combinada (cART), que associa dois ou três fármacos antirretrovirais, a cura funcional pode depender da combinação de várias terapias, já existentes ou em desenvolvimento, com alvos distintos.

Um exemplo é a combinação de quatro tipos de bNAb-based CARs. Uma cultura de células T infetadas pelo HIV na presença de ART e de células T modificadas geneticamente com CARs baseados nos bNAbs PGT-128 (região V3) [56], PGT-145 (região V1/V2) [26], VRC07-523 (região de ligação à molécula CD4 na gp120) [60] e 10E8 (gp41), resultou numa ativação específica e na morte das células infetadas [58].

Por outro lado, uma vez que o HIV pode utilizar diferentes co-recetores para entrar nas células alvo, a combinação de terapias será também uma estratégia para ter como alvo não

só o vírus R5 como também o X4, com tropismo para os co-receptores CCR5 e CXCR4, respetivamente. Assim, um terceiro exemplo utiliza adenovírus para o *delivery* de ZFN cujo efeito é a redução em 20 % de ambos os co-recetores à superfície das células T CD4<sup>+</sup> [61].

### **3.6 Barreiras na implementação das novas terapias nos países em desenvolvimento**

Na procura de uma terapia anti-HIV raramente é suficiente focar nos três pontos-chave do desenvolvimento de um medicamento: eficácia, qualidade e segurança. Dado que o HIV é transmissível através de fluídos biológicos e que afeta sobretudo o sistema imune dos residentes em países em desenvolvimento, é necessário ter também presente o custo de desenvolvimento e de implementação da terapêutica e a sua escalabilidade.

A ART é a única terapêutica implementada atualmente e, apesar de ter um custo relativamente baixo, apenas 73 % de todas as pessoas que vivem com o HIV é que lhe têm acesso [10]. Segundo a *American Medical Association*, os regimes antirretrovirais nos países desenvolvidos custam até 41 mil euros por mês, enquanto nos países em desenvolvimento o custo dos mesmos regimes é tão baixo como 23 euros por mês [24]. Este facto vem sublinhar a importância da relação custo-eficácia (vale a pena investir na estratégia terapêutica?) como também sobre o impacto orçamental a ela associado (a estratégia vai ser de fácil acesso?), uma vez que o custo da terapêutica é determinante no sucesso da mesma [36]. Por exemplo, segundo um estudo realizado em Houston, EUA, para além da produção de células imunes modificadas ser cara, trabalhosa e demorada, os custos das fases I, II e III dos ensaios clínicos da terapia com células NK CAR são, no mínimo, 1.7, 4.2 e 8.5 milhões de euros, respetivamente [59].

Como referido anteriormente, a ART não tem carácter curativo e, por isso, a procura de uma terapêutica anti-HIV continua a ser uma realidade. As várias terapias inovadoras que têm vindo a ser estudadas exigem muitos anos de investigação e de avaliação para se tornarem clinicamente relevantes e, conseqüentemente, estão associadas a grandes investimentos. No entanto, eventualmente, o custo que está associado à ART que tem de ser continuada o resto da vida do doente pode ser comparado com o custo de uma terapia que, embora mais cara por si só, poderá vir a ser de administração única [62].

O único método possível para testar uma terapia inovadora curativa e avaliar o seu sucesso é por interrupção da ART. Após administração da terapia inovadora e paragem da ART é possível averiguar se o HIV volta ou não a ser detetável e se há um aumento da carga viral. Conseqüentemente, esta interrupção pode trazer riscos significativos que serão tão



minimizados quanto mais estrita for a monitorização dos doentes e quanto mais cedo for reiniciada a ART após o ressurgimento da carga viral detetável [51].

Adicionalmente, os ensaios clínicos requeridos para a autorização de introdução no mercado de uma terapia inovadora exigem a participação de voluntários infetados pelo HIV. Por isso, e sabendo que as populações em maior risco de infeção pelo HIV são as de mais difícil acesso, os recrutadores e investigadores têm o desafio de alcançar estas populações e de estabelecer uma relação com os voluntários para que estes, conhecendo todos os seus direitos e riscos, consintam e se comprometam a participar nos ensaios clínicos. Para além disso, deve ser assegurado que os voluntários saibam que a terapia em estudo tem um carácter experimental e que não pode ser assumida como curativa ou como algo que dispensa as demais medidas de prevenção de transmissão do vírus [52].

Por outro lado, para além do custo, a logística geralmente associada a uma terapia inovadora tem uma robustez que não é compatível com países pouco desenvolvidos. Países como o Gambia que em 2020 registou mais 2 100 infetados pelo HIV [63], perfazendo um total de 27 000 infetados, não tem as instalações necessárias a uma possível administração injetável e conseqüente acompanhamento e monitorização do doente. Assim, outros aspetos relevantes a ter em consideração no desenvolvimento de uma terapia contra um vírus que afeta sobretudo países pouco desenvolvidos são as condições necessárias ao armazenamento e ao transporte adequados e a via de administração, preferencialmente oral.

O fim da epidemia por HIV depende, assim, do cruzamento das variantes económica, logística, regulamentar e psicossocial. De igual forma é fundamental que exista um investimento na literacia em saúde, sobretudo nos países pouco desenvolvidos, para que as populações residentes nas regiões endémicas sejam incentivadas à prevenção e à testagem.

## CONCLUSÃO

O HIV-1 é um retrovírus que afeta o sistema imune de milhões de pessoas em todo o mundo, sendo o continente Africano o mais afetado. Atualmente, apesar de ainda não existir uma cura para a infecção pelo HIV-1, este vírus pode ser controlado através do cuidado médico apropriado e da toma da cART, que veio trazer aos doentes infetados por HIV-1 uma melhor qualidade de vida e, ao reduzir a carga viral, veio também minorar a probabilidade de transmissão do vírus através dos fluídos biológicos.

No entanto, de acordo com a “*Fact Sheet 2021*”, apenas 73 % dos infetados por HIV tem acesso à ART. Por isso, e dado que a ART é de carácter crónico, o desenvolvimento de uma terapia curativa inovadora que seja segura, eficaz, escalável, custo-efetiva, que proteja contra a possível reinfeção por HIV-1 e cujo efeito seja duradouro é uma prioridade global. Contudo, esta tarefa vê-se dificultada devido à capacidade do HIV-1 estabelecer latência pré e pós-integracional, formando reservatórios de difícil acesso, e devido à variabilidade genética que permite ao HIV-1 escapar ao sistema imune.

Outro fator a ter em consideração no combate à infecção pelo HIV-1 é a escassez de recursos nos países pouco desenvolvidos, onde não existem infraestruturas especializadas, locais que permitam o armazenamento a baixa temperatura e onde não existem condições que permitam a administração e consequente monitorização dos doentes.

Posto isto, há abordagens de terapia molecular, como o transplante de células estaminais hematopoiéticas com mutação CCR5 $\Delta$ 32, que devido a questões éticas, ao seu custo elevado e à incapacidade de implementação à escala global, não são promissoras. Contrariamente, a utilização combinada de nucleases, de ribozimas e/ou de moléculas RNA *interference* poderá vir a ser a estratégia indicada na cura do HIV-1. No entanto, acredito que o fim desta epidemia passará não apenas por uma abordagem genética, mas também por um reforço do sistema imune, seja através da transferência de anticorpos, seja através da terapia com células T CAR.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] SCHMID, Sonja - The discovery of HIV-1. **Nature Milestone**. (2018).
- [2] FIRMINO, Teresa - Odette Ferreira (1925-2018), pioneira na investigação e luta contra a sida. **Público**. (7 out. 2018). Disponível em: <https://www.publico.pt/2018/10/07/ciencia/noticia/morreu-odette-ferreira-pioneira-na-investigacao-e-luta-contra-a-sida-em-portugal-1846505>
- [3] BLOOD, German Advisory Committee - Human Immunodeficiency Virus (HIV). **Transfusion medicine and hemotherapy: offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie**. ISSN 1660-3796 (Print). 43:3 (2016) 203–222.
- [4] BARRAS, Colin - **We know the city where HIV first emerge**. Atual. 19 nov. 2015. Disponível em: <http://www.bbc.com/earth/story/20151119-we-know-the-city-where-hiv-first-infected-a-human>
- [5] NYAMWEYA, Samuel *et al.* - Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. **Reviews in medical virology**. England. ISSN 1099-1654 (Electronic). 23:4 (2013) 221–240.
- [6] LI, Guangdi; CLERCQ, Erik DE - HIV Genome-Wide Protein Associations: a Review of 30 Years of Research. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**. ISSN 1098-5557. 80:3 (2016) 679–731.
- [7] GUERREIRO, Rita; SANTOS-COSTA, Quirina; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. - The chemokines and their receptors: characteristics and physiological functions. **Acta medica portuguesa**. Portugal. ISSN 1646-0758 (Electronic). 24 (2011) 967–976.
- [8] KWARTENG, Alexander; AHUNO, Samuel Terkper; KWAKYE-NUAKO, Godwin - The therapeutic landscape of HIV-1 via genome editing. **AIDS research and therapy**. ISSN 1742-6405 (Electronic). 14:1 (2017) 32.
- [9] UNAIDS - **HIV and AIDS - Basic facts** [Consult. 6 jun. 2021]. Disponível em: <https://www.unaids.org/en/frequently-asked-questions-about-hiv-and-aids>
- [10] UNAIDS - **FACT SHEET 2021**. Disponível em: [https://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/UNAIDS\\_FactSheet\\_en.pdf](https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_en.pdf)
- [11] UNAIDS - **UNAIDS data 2020**. Switzerland : [s.n.] Disponível em: [https://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/2020\\_aids-data-book\\_en.pdf](https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/2020_aids-data-book_en.pdf)

- [12] WHO - **Latest HIV estimates and updates on HIV policies uptake, July 2020**. Disponível em: [https://www.who.int/docs/default-source/hiv-hq/presentation-international-aids-conference-2020.pdf?sfvrsn=cbd9bbc\\_4](https://www.who.int/docs/default-source/hiv-hq/presentation-international-aids-conference-2020.pdf?sfvrsn=cbd9bbc_4)
- [13] ASSEFA, Yibeltal; GILKS, Charles F. - Ending the epidemic of HIV/AIDS by 2030: Will there be an endgame to HIV, or an endemic HIV requiring an integrated health systems response in many countries? **International Journal of Infectious Diseases**. ISSN 1201-9712. 100 (2020) 273–277.
- [14] EISINGER, Robert Walter; FAUCI, Anthony - Ending the HIV/AIDS Pandemic. **Emerging Infectious Disease journal**. ISSN 1080-6059. 24:3 (2018) 413.
- [15] UNAIDS - **HIV Prevention 2020 Road Map**. Switzerland : [s.n.] Disponível em: [https://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/hiv-prevention-2020-road-map\\_en.pdf](https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/hiv-prevention-2020-road-map_en.pdf)
- [16] UNAIDS - **2025 AIDS TARGETS**. Switzerland : [s.n.] Disponível em: [https://www.unaids.org/sites/default/files/2025-AIDS-Targets\\_en.pdf](https://www.unaids.org/sites/default/files/2025-AIDS-Targets_en.pdf)
- [17] UNAIDS - **Rights in the time of COVID-19 — Lessons from HIV for an effective, community-led response**. Atual. 2020. [Consult. 4 jun. 2021]. Disponível em: <https://www.unaids.org/en/resources/documents/2020/human-rights-and-covid-19>
- [18] ARV - **15 Years of Support for People Living with HIV**. Atual. 2017. [Consult. 4 jun. 2021]. Disponível em: <https://auacambodia.org/2017/01/27/15-years-of-aual>
- [19] UNAIDS - **Big drops in the cost of antiretroviral medicines, but COVID-19 threatens further reductions**. Atual. 2021. [Consult. 4 jun. 2021]. Disponível em: [https://www.unaids.org/en/resources/presscentre/featurestories/2021/may/20210503\\_cost-of-antiretroviral-medicines](https://www.unaids.org/en/resources/presscentre/featurestories/2021/may/20210503_cost-of-antiretroviral-medicines)
- [20] WATERFIELD, Kristie C. *et al.* - Consequences of COVID-19 crisis for persons with HIV: the impact of social determinants of health. **BMC Public Health**. ISSN 1471-2458. 21:1 (2021) 299.
- [21] NDUNG’U, Thumbi; MCCUNE, Joseph M.; DEEKS, Steven G. - Why and where an HIV cure is needed and how it might be achieved. **Nature**. England. ISSN 1476-4687 (Electronic). 576:7787 (2019) 397–405.
- [22] NEWSROOM, NIH - «Mississippi Baby» Now Has Detectable HIV, Researchers Find. **HIV.gov**. (2014).
- [23] LUZURIAGA, Katherine *et al.* - Viremic Relapse after HIV-1 Remission in a Perinatally Infected Child. **New England Journal of Medicine**. ISSN 0028-4793. 372:8 (2015) 786–788.

- [24] SAAG, Michael S. *et al.* - Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2020 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. **JAMA**. United States. ISSN 1538-3598 (Electronic). 324:16 (2020) 1651–1669.
- [25] SNS - Profilaxia pré-exposição. **SNS**. (5 dez. 2017). Disponível em: <https://www.sns.gov.pt/noticias/2017/12/05/vih-e-sida-profilaxia-pre-exposicao/>
- [26] LIU, Bingfeng; ZHANG, Wanying; ZHANG, Hui - Development of CAR-T cells for long-term eradication and surveillance of HIV-1 reservoir. **Current Opinion in Virology**. ISSN 1879-6257. 38 (2019) 21–30.
- [27] MARGOLIS, David M. *et al.* - Curing HIV: Seeking to Target and Clear Persistent Infection. **Cell**. United States. ISSN 1097-4172 (Electronic). 181:1 (2020) 189–206.
- [28] RUIZ, Alba *et al.* - Antigen Production After Latency Reversal and Expression of Inhibitory Receptors in CD8+ T Cells Limit the Killing of HIV-1 Reactivated Cells. **Frontiers in immunology**. ISSN 1664-3224 (Electronic). 9 (2018) 3162.
- [29] AHLENSTIEL, Chantelle L. *et al.* - Block and Lock HIV Cure Strategies to Control the Latent Reservoir. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. ISSN 2235-2988. 10 (2020) 424.
- [30] MORANGUINHO, Ines; VALENTE, Susana T. - Block-And-Lock: New Horizons for a Cure for HIV-1. **Viruses**. ISSN 1999-4915 (Electronic). 12:12 (2020).
- [31] PERNET, Olivier; YADAV, Swati Seth; AN, Dong Sung - Stem cell-based therapies for HIV/AIDS. **Advanced Drug Delivery Reviews**. ISSN 0169-409X. 103 (2016) 187–201.
- [32] BROWN, Timothy Ray - I am the Berlin patient: a personal reflection. **AIDS research and human retroviruses**. ISSN 1931-8405. 31:1 (2015) 2–3.
- [33] ALLERS, Kristina; SCHNEIDER, Thomas - CCR5 $\Delta$ 32 mutation and HIV infection: basis for curative HIV therapy. **Current Opinion in Virology**. ISSN 1879-6257. 14 (2015) 24–29.
- [34] ROBERTS, Michelle - Second patient cured of HIV, say doctors. **BBC News**. (10 mar. 2020). Disponível em: <https://www.bbc.com/news/health-51804454>
- [35] GUPTA, Ravindra K. *et al.* - HIV-1 remission following CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 haematopoietic stem-cell transplantation. **Nature**. ISSN 1476-4687. 568:7751 (2019) 244–248.
- [36] DEEKS, Steven G. *et al.* - International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016. **Nature medicine**. ISSN 1546-170X (Electronic). 22:8 (2016) 839–850.
- [37] MIYAOKA, Yuichiro *et al.* - Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of

locus, nuclease, and cell type on genome-editing. **Scientific Reports**. ISSN 2045-2322. 6:1 (2016) 23549.

[38] GAJ, Thomas; GERSBACH, Charles A.; BARBAS, Carlos F. 3rd - ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Trends in biotechnology**. ISSN 1879-3096 (Electronic). 31:7 (2013) 397–405.

[39] DRAKE, Mary Jane; BATES, Paul - Application of gene-editing technologies to HIV-1. **Current opinion in HIV and AIDS**. ISSN 1746-6318. 10:2 (2015) 123–127.

[40] CRIBBS, Adam P.; PERERA, Sumeth M. W. - Science and Bioethics of CRISPR-Cas9 Gene Editing: An Analysis Towards Separating Facts and Fiction. **The Yale journal of biology and medicine**. . ISSN 1551-4056 (Electronic). 90:4 (2017) 625–634.

[41] GAO, Feng *et al.* - DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute. **Nature Biotechnology**. ISSN 1546-1696. 34:7 (2016) 768–773.

[42] SCARBOROUGH, Robert J.; GATIGNOL, Anne - HIV and Ribozymes. **Advances in experimental medicine and biology**. United States. ISSN 0065-2598 (Print). 848 (2015) 97–116.

[43] ROSSI, J. J. - The application of ribozymes to HIV infection. **Current opinion in molecular therapeutics**. England. ISSN 1464-8431 (Print). 1:3 (1999) 316–322.

[44] UNWALLA, Hoshang J.; ROSSI, John J. - A dual function TAR Decoy serves as an anti-HIV siRNA delivery vehicle. **Virology Journal**. ISSN 1743-422X. 7:1 (2010) 33.

[45] FROEYEN, M.; HERDEWIJN, P. - RNA as a target for drug design, the example of Tat-TAR interaction. **Current topics in medicinal chemistry**. United Arab Emirates. ISSN 1568-0266 (Print). 2:10 (2002) 1123–1145.

[46] DIGIUSTO, David L. *et al.* - RNA-based gene therapy for HIV with lentiviral vector-modified CD34(+) cells in patients undergoing transplantation for AIDS-related lymphoma. **Science translational medicine**. ISSN 1946-6242. 2:36 (2010) 36-43.

[47] SCARBOROUGH, Robert J.; GATIGNOL, Anne - RNA Interference Therapies for an HIV-1 Functional Cure. **Viruses**. ISSN 1999-4915 (Electronic). 10:1 (2017).

[48] PRAKASH, Satya; MALHOTRA, Meenakshi - Recent Advancements in Targeted Delivery of Therapeutic Molecules in Neurodegenerative Disease—Spinocerebellar Ataxia—Opportunities and Challenges. **Drug Target Insights**. ISSN 1177-3928. 3 (2008) DTI.S378.

[49] SHIMIZU, Saki *et al.* - RNAi-Mediated CCR5 Knockdown Provides HIV-1 Resistance to

Memory T Cells in Humanized BLT Mice. **Molecular therapy. Nucleic acids**. ISSN 2162-2531 (Print). 4:2 (2015) 227.

[50] WOLDEMESKEL, Bezawit A.; KWAA, Abena K.; BLANKSON, Joel N. - Viral reservoirs in elite controllers of HIV-1 infection: Implications for HIV cure strategies. **EBioMedicine**. ISSN 2352-3964 (Electronic). 62 (2020) 103118.

[51] PACE, Matthew; FRATER, John - A cure for HIV: is it in sight? **Expert Review of Anti-infective Therapy**. ISSN 1478-7210. 12:7 (2014) 783–791.

[52] HEGER, Elizabeth; SCHUETZ, Alexandra; VASAN, Sandhya - HIV Vaccine Efficacy Trials: RV144 and Beyond. **Advances in experimental medicine and biology**. United States. ISSN 0065-2598 (Print). 1075 (2018) 3–30.

[53] NEWSROOM, NIH - **Passive Antibody Transfer as HIV Prevention**. Atual. 2018. [Consult. 22 jul. 2021]. Disponível em: <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/passive-antibody-transfer>

[54] HSU, Denise C.; O'CONNELL, Robert J. - Progress in HIV vaccine development. **Human vaccines & immunotherapeutics**. ISSN 2164-554X. 13:5 (2017) 1018–1030.

[55] JONES, Letitia D.; MOODY, M. Anthony; THOMPSON, Amelia B. - Innovations in HIV-1 Vaccine Design. **Clinical therapeutics**. ISSN 1879-114X (Electronic). 42:3 (2020) 499–514.

[56] LIU, Huan *et al.* - Receptor binding domain based HIV vaccines. **BioMed research international**. ISSN 2314-6141. 2015 (2015) 594109.

[57] JACOBSON, Jeffrey M.; FLEXNER, Charles W. Universal antiretroviral regimens: thinking beyond one-pill-once-a-day. **Current opinion in HIV and AIDS**. ISSN 1746-6318 (Electronic). 12:4 (2017) 343–350.

[58] QI, Jinxin *et al.* - Advances in Developing CAR T-Cell Therapy for HIV Cure. **Frontiers in immunology**. ISSN 1664-3224. 11 (2020) 361.

[59] LIU, Dongfang *et al.* - Chimeric antigen receptor (CAR)-modified natural killer cell-based immunotherapy and immunological synapse formation in cancer and HIV. **Protein & cell**. ISSN 1674-8018 (Electronic). 8:12 (2017) 861–877.

[60] GAUDINSKI, Martin R. *et al.* - Safety and pharmacokinetics of broadly neutralising human monoclonal antibody VRC07-523LS in healthy adults: a phase I dose-escalation clinical trial. **The Lancet HIV**. ISSN 2352-3018. 6:10 (2019) e667–e679.

[61] DIDIGU, Chuka A. *et al.* - Simultaneous zinc-finger nuclease editing of the HIV coreceptors ccr5 and cxcr4 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. **Blood**. ISSN 1528-0020. 123:1 (2014) 61–69.

[62] DEY, R.; PILLAI, B. - Cell-based gene therapy against HIV. **Gene therapy**. England. ISSN 1476-5462 (Electronic). 22:11 (2015) 851–855.

[63] UNAIDS - **Country factsheets GAMBIA | 2020**. Disponível em: <https://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/gambia>