



João Paulo Braz Pires Leitão Abreu

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Microbiota Intestinal: Da Disbiose à Doença Extra-Intestinal” referentes à Unidade Curricular “Estágio Curricular”, sob a orientação, respetivamente, da Dr.<sup>a</sup> Laura Maria dos Santos Coelho, da Dr.<sup>a</sup> Mariana Cássio de Sousa Mergulhão Pêra e da Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

João Paulo Braz Pires Leitão Abreu

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Microbiota Intestinal: Da Disbiose à Doença Extra-Intestinal” referentes à Unidade Curricular “Estágio Curricular”, sob a orientação, respetivamente, da Dr.<sup>a</sup> Laura Maria dos Santos Coelho, da Dr.<sup>a</sup> Mariana Cássio de Sousa Mergulhão Pêra e da Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, João Paulo Braz Pires Leitão Abreu, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2012137989, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Microbiota Intestinal: Da Disbiose à Doença Extra-Intestinal” 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, 4 de setembro de 2017.

João Paulo Braz Pires Leitão Abreu  
(João Paulo Braz Pires Leitão Abreu)

## **Agradecimentos**

O meu sincero agradecimento:

*À minha família, principalmente ao meu Pai e Irmã, por todo o apoio incondicional, desde sempre e para sempre;*

*A todos os meus amigos e colegas que me acompanharam ao longo deste percurso, especialmente a Sofia e o João, por toda a paciência, dedicação e partilha dos melhores e piores momentos, contribuindo para o meu sucesso académico;*

*Às equipas da Farmácia do Forum e da Labialfarma, pelo constante apoio, paciência, amizade, boa disposição e companheirismo demonstrado. Foram cruciais nos meus estágios;*

*À Professora Doutora Sara Domingues, pelo incansável apoio e orientação.*

*A todos vós, muito obrigado, só assim foi possível chegar até aqui!*

*Em memória da minha Mãe.*

## Índice

	Página
<b>Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária</b>	
Lista de Abreviaturas	10
1 – Introdução	11
2 – Análise SWOT ( <i>Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats</i> )	12
2.1 – Pontos Fortes	12
2.1.1 – Equipa Técnica	12
2.1.2 – Localização e Horário do Estágio	12
2.1.3 – Sifarma 2000®	12
2.1.4 – Conferência de Encomendas	13
2.1.5 – Realização de Encomendas	13
2.1.6 – Robot Rowa VMax	13
2.1.7 – Atendimento ao Balcão	14
2.1.8 – Medicamentos Manipulados	16
2.1.9 – Medicamentos de Uso Veterinário	16
2.1.10 – Outros Produtos de Saúde	17
2.1.11 – Conferência do Receituário	17
2.1.12 – Conferência das Validades dos Produtos	18
2.1.13 – Realização de Inventário	18
2.1.14 – Determinação de Parâmetros Bioquímicos e Fisiológicos	18
2.1.15 – Plano Curricular do MICF (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas)	19
2.2 – Pontos Fracos	19
2.2.1 – Plano Curricular do MICF (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas)	19
2.2.2 – Receitas Manuais	20
2.2.3 – Dispensa Automatizada	20
2.3 – Oportunidades	21
2.3.1 – Formações	21
2.3.2 – Serviços Permanentes	21
2.3.3 – Consultas de Nutrição	21
2.3.4 – Eventos de marcas com presença de respetivas conselheiras	22
2.4 – Ameaças	22

2.4.1 – Parafarmácias	22
2.4.2 – Prescrição por DCI (Denominação Comum Internacional)	22
2.4.3 – Informação relativa ao preço máximo do medicamento constante na guia de tratamento	23
3 – Casos Clínicos	23
3.1 – Caso Clínico 1	23
3.2 – Caso Clínico 2	24
4 – Considerações Finais	25

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

Lista de Abreviaturas	27
1 – Introdução	28
2 – Análise SWOT ( <i>Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats</i> )	30
2.1 – Pontos Fortes	30
2.1.1 – Equipa Técnica	30
2.1.2 – Higiene e Segurança no Trabalho	30
2.1.3 – Variedade de Análises e Procedimentos	30
2.1.4 – Bom Domínio da Língua Inglesa	32
2.1.5 – Registo de Operações	33
2.1.6 – Adaptação Curricular	33
2.2 – Pontos Fracos	34
2.2.1 – Duração do Estágio	34
2.2.2 – Abrangência do Estágio	34
2.3 – Oportunidades	35
2.3.1 – Visitas e Auditorias	35
2.3.2 – Variedade de Profissionais	35
2.4 – Ameaças	36
2.4.1 – Localização do Estágio	36
3 – Considerações Finais	37

## **Microbiota Intestinal: Da Disbiose à Doença Extra-Intestinal**

Resumo	39
Abstract	39
Lista de Abreviaturas	41

1 – Introdução	42
2 – Composição, Biogeografia e Desenvolvimento da Microbiota Intestinal	42
3 – Fatores Influenciadores da Microbiota Intestinal	45
3.1 – Dieta	45
3.2 – Fármacos	45
3.3 – Muco Intestinal	46
3.4 – Sistema Imunitário	46
3.5 – Genética	47
4 – Da Normalidade à Disbiose	48
5 – Nefrolitíase	49
6 – Síndrome do Fígado Gordo Não-Alcoólico	51
7 – Asma	57
8 – Terapias e Desafios Futuros	61
9 – Considerações Finais	62
<b>Bibliografia</b>	<b>63</b>

## Índice de Figuras

	Página
<b>Figura 1</b> – Composição e biogeografia da microbiota intestinal humana	43
<b>Figura 2</b> – Modulação do sistema imunitário pela microbiota intestinal, com alguns exemplos concretos	47
<b>Figura 3</b> – Comparação da microbiota saudável com os diferentes tipos de disbiose	49
<b>Figura 4</b> – Influência da microbiota intestinal na patogénese do Síndrome do Fígado Gordo Não Alcoólico	52
<b>Figura 5</b> – Comparação da abundância de géneros presentes (A), da largura das <i>tight junctions</i> (B), da expressão da proteína ocludina (C), da quantidade de linfócitos T CD4+ e CD8+ (D) e da expressão relativa de RNA mensageiro codificante para citocinas inflamatórias (E) entre indivíduos doentes e indivíduos do grupo controlo	55
<b>Figura 6</b> – Patogénese da asma alérgica (ou atópica)	58

João Paulo Braz Pires Leitão Abreu

**Relatório de Estágio Curricular em Farmácia Comunitária**

Relatório de Estágio referente à Unidade Curricular “Estágio Curricular”, sob a orientação da Dr.<sup>a</sup> Laura Maria dos Santos Coelho, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## **Lista de Abreviaturas**

- DCI – Denominação Comum Internacional
- IFASF – Intervenção Farmacêutica em Auto-cuidados de Saúde e Fitoterapia
- MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
- MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica
- MSRM – Medicamento Sujeito a Receita Médica
- REM – Receita Eletrónica Materializada
- RM – Receita Manual
- RSP – Receita Sem Papel
- SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

## I – Introdução

A profissão de Farmacêutico é cada vez mais relevante na nossa sociedade, sendo no setor da farmácia comunitária que se torna mais visível. Ao analisar os primeiros tempos da profissão, o farmacêutico era considerado o profissional do medicamento e a sua atividade centrava-se na dispensa do mesmo. Contudo, hoje atua não só como elo de ligação final entre o medicamento e o utente mas também é visto como alguém em que o utente confia e aborda para pedir conselhos e resolver os seus problemas de saúde, revelando-se como um importante agente de saúde pública e uma peça fundamental na promoção do bem-estar geral da população. Assim, hoje a farmácia comunitária não é apenas um espaço de cedência de medicamentos mas sim um local de prestação de serviços, de aconselhamento, onde os utentes têm confiança quando procuram soluções para os seus problemas de saúde.

É essencial para nós, estudantes do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) e futuros farmacêuticos, contactar com a realidade da farmácia comunitária e, no segundo semestre do quinto ano do MICF, é-nos dada a oportunidade de o fazer. A unidade curricular denominada Estágio Curricular permite colocar em prática e consolidar todo o conhecimento teórico e prático adquirido ao longo dos últimos quatro anos e meio, e ao mesmo tempo ganhar experiência e novas competências, tendo em vista a melhor preparação possível para o mercado de trabalho.

O meu estágio curricular decorreu na Farmácia do Forum, tendo início dia 9 de janeiro de 2017 e terminou no dia 28 de abril de 2017, sob a orientação da diretora técnica Dr.<sup>a</sup> Laura Maria dos Santos Coelho.

O presente relatório apresenta-se sobre a forma de análise *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats (SWOT)*, onde saliento os pontos positivos e negativos do meu estágio, na dimensão interna e externa do mesmo, tendo como objetivo apresentar uma análise crítica e sucinta ao meu estágio, tanto relativamente às atividades desenvolvidas e competências adquiridas como também da adequação do plano de estudos do MICF à realidade prática e perspetivas futuras.

## **2 – Análise SWOT**

### **2.1 – Pontos Fortes**

#### **2.1.1 – Equipa Técnica**

A equipa técnica da Farmácia do Forum é composta por dezasseis profissionais, incluindo farmacêuticos, técnicos de farmácia e técnicos auxiliares de farmácia. Equipa jovem e muito dinâmica, facilitou bastante a minha integração, elucidando sobre as diferentes gamas de produtos e esclarecendo toda e qualquer dúvida que me surgiu durante o estágio. Foi, sem dúvida, o pilar mais importante do meu estágio, permitindo a minha participação em todas as atividades da farmácia, ao mesmo tempo que me dotaram de imensos conhecimentos e competências. Sem ela, nada teria sido possível.

#### **2.1.2 – Localização e Horário do Estágio**

A Farmácia do Forum está localizada no centro comercial Fórum Coimbra e tem como horário de funcionamento das 9h às 24h, todos os dias. Tanto a localização como o horário de funcionamento permitiram uma maior heterogeneidade de casos e utentes, bem como uma maior quantidade de atendimentos, contribuindo para o desenvolvimento da minha capacidade de atendimento e aconselhamento.

#### **2.1.3 – Sifarma 2000<sup>®</sup>**

O Sifarma 2000<sup>®</sup> é o programa de gestão farmacêutica utilizado pela Farmácia do Forum, estando disponível em todos os computadores da mesma. Este *software* permite realizar inúmeras atividades, auxiliando o operador nas diversas tarefas a realizar na farmácia.

Primeiramente, é através do Sifarma 2000<sup>®</sup> que se realizam a maior parte das encomendas (exceto as realizadas por telefone e em plataformas específicas) e suas respetivas conferências, permitindo um controlo rigoroso dos produtos encomendados em comparação com os recebidos. É também através desta aplicação que se realizam devoluções de produtos (estejam eles danificados, fora da validade ou enviados por engano pelo fornecedor) e se faz a gestão dos *stocks* existentes na farmácia, através da fixação de um *stock* mínimo e máximo de cada produto.

Outra grande vantagem do Sifarma 2000<sup>®</sup> é a possibilidade de criação de fichas de utente que permitem aceder a um histórico de todos os produtos adquiridos pelo utente, o que se torna bastante útil aquando da dispensa dos mesmos. Frequentemente os utentes não sabem, no caso dos medicamentos genéricos, qual o laboratório que costumam tomar, o

que pode levar a que se confundam caso a embalagem cedida seja diferente daquela que estão habituados. Nestes casos, a sua ficha permite assegurar que o medicamento dispensado é igual ao que costumam levar, contribuindo para o aumento da adesão à terapêutica e para a diminuição de erros associados à medicação.

Por último, o Sifarma 2000<sup>®</sup> possui informação científica organizada e atualizada para os diferentes medicamentos, o que auxilia em caso de dúvida sobre potenciais interações medicamentosas, precauções e contraindicações.

#### **2.1.4 – Conferência de Encomendas**

No início do estágio, realizei essencialmente atividades relacionadas com as encomendas, desde a conferência das mesmas, ao armazenamento dos produtos no robot ou outros locais apropriados e à organização dos produtos reservados. Foi nesta etapa inicial que tive o primeiro contacto com os diferentes produtos, onde pude começar a assimilar a variedade e localização dos mesmos na farmácia, a associar substâncias ativas a nomes comerciais e a corresponder certas características das embalagens a certos laboratórios. Também foi importante na medida em que me dotou de competências na resolução de problemas relacionados com as encomendas, como reclamação de produtos em falta ou de devolução de produtos não encomendados.

Esta etapa foi crucial para o meu estágio, uma vez que facilitou bastante o atendimento e o aconselhamento, tanto por conhecer os produtos como a sua localização dentro da farmácia.

#### **2.1.5 – Realização de Encomendas**

Mais tardiamente, tive também a oportunidade de assistir à realização e inclusive de realizar encomendas. Enquanto a encomenda é feita, há que ter em conta vários aspetos, nomeadamente o *stock* presente na farmácia, a media de vendas do produto em questão por mês e quantas unidades já foram vendidas no presente mês. Ao ter esta oportunidade, pude contactar com a realidade da gestão de *stocks* e os diferentes fatores a ter em conta, com o objetivo da melhor otimização de *stocks* e da melhor rentabilidade do espaço de armazenamento disponível possível.

#### **2.1.6 – Robot Rowa VMax**

A Farmácia do Forum está munida com um robot de armazenamento acoplado ao Sifarma 2000<sup>®</sup>. Este cede os produtos quando solicitado, seja no atendimento ou fora dele, trazendo várias vantagens tanto para a organização da farmácia como para a dinâmica do atendimento.

Por um lado, tem uma grande capacidade de armazenamento num espaço físico menor do que o necessário caso a arrumação fosse feita somente em armários e gavetas. Este equipamento possui um leitor ótico seguido de uma esteira de armazenamento. Quando se procede ao armazenamento, o robot lê o código do produto, embalagem a embalagem, e é registado o prazo de validade, utilizando um ecrã associado ao mesmo. Uma vez na esteira de armazenamento, as embalagens são organizadas pelo robot de acordo com os tamanhos e prazos de validade.

Por outro lado, devido ao facto de não ser necessário sair do balcão para procurar os medicamentos necessários, torna o atendimento mais dinâmico e permite-nos dispensar uma maior porção de tempo com o utente. Para além disso, o robot gere os produtos de modo a ceder sempre segundo o prazo de validade mais curto, o que resulta uma melhor gestão dos mesmos. De salientar ainda que, na presença de receita médica, as embalagens dispensadas pelo robot são definidas consoante o presente na mesma, evitando eventuais erros, na medida em que não são dispensadas embalagens com nomes, dosagens e tamanhos diferentes.

Pude lidar com este equipamento logo a partir do primeiro dia de estágio, numa primeira fase a nível de receção de encomendas e reposição de produtos e depois mais tarde ao nível do atendimento, chegando à conclusão que a presença do robot permite uma redução de erros e uma maior agilização de processos.

### **2.1.7 – Atendimento ao Balcão**

O atendimento dos utentes ao balcão constitui o núcleo do funcionamento de todas as farmácias, pois é para este momento que todo o trabalho de *back-office* é desenvolvido.

O ato de dispensa de medicamentos e de outros produtos de saúde constitui uma atividade de grande importância e responsabilidade, onde o farmacêutico deve promover o uso racional do medicamento, a adesão à terapêutica e prestar todas as informações para que esta seja seguida corretamente.

Inicialmente, comecei por assistir a atendimentos de outros membros da equipa, onde me foi explicado todo o processo de atendimento, desde das várias perguntas pertinentes que se devem colocar ao utente nas variadas situações até à venda propriamente dita. Mais uma vez saliento a importância da equipa técnica, incansável, sempre pronta a transmitir todo o conhecimento e dotar-me de todas as competências essenciais ao atendimento ao público.

Nos primeiros tempos, nem tudo correu naturalmente, derivado de algum nervosismo e inexperiência, uma vez que para além de toda a atenção que tinha de ser prestada ao utente, era também necessário efetuar o processo de venda no Sifarma 2000®. Contudo, com o

passar do tempo, tanto com o número e variedade elevada de atendimentos como com o apoio da equipa técnica, estes obstáculos foram ultrapassados.

Uma das situações mais comuns no atendimento ao público é a cedência de medicamentos de acordo com uma prescrição médica. Durante o meu estágio contactei com diferentes tipos de prescrição: Receitas Manuais (RM), Receitas Eletrónicas Materializadas (REM) e Receitas Sem Papel (RSP). É de salientar que as RSP possuem a vantagem para o utente de poder levar apenas os medicamentos e quantidades que necessita, tendo a opção de adquirir posteriormente os restantes até ao prazo indicado na guia de tratamento, algo que não acontece nas RM e nas REM. Outro aspeto das RSP é a possibilidade, caso o utente desejar, de receber uma mensagem no telemóvel com os dados necessários para o acesso à receita (número da prescrição, código de acesso e código de opção), não sendo necessário qualquer suporte em papel.

Aquando a dispensa de medicamentos mediante prescrição médica, existem vários fatores a ter em conta. Há que perceber se a medicação prescrita já é habitual, e em caso afirmativo, saber qual o laboratório que costumam levar. Este é um ponto de especial relevância no caso dos idosos que, muitas vezes polimedicados, têm maior dificuldade em distinguir os vários medicamentos que tomam ou que dizem que apenas se sentem bem com um determinado genérico. As fichas de utente contribuem na resolução deste problema, permitindo identificar o medicamento exato em causa. Por outro lado, existem utentes que apenas desejam adquirir os medicamentos originais, muitas vezes por duvidarem da eficácia e segurança dos respetivos genéricos. Nesta situação, compete-nos a nós explicar ao utente que os medicamentos genéricos também possuem qualidade, eficácia e segurança.

Para além dos MSRM, existem outros produtos de saúde que se vendem na farmácia, nomeadamente medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM). Apesar de estes medicamentos não necessitarem de prescrição médica para serem cedidos, requerem igualmente vários cuidados no momento da dispensa. Quando um utente se dirige à farmácia com o intuito de adquirir um MNSRM, devemos sempre perceber para que efeito o utente o deseja. Se perante o efeito desejado, o medicamento solicitado for o mais adequado, este deve ser cedido, acompanhado de conselhos e informações relativos à sua posologia, possíveis interações medicamentosas, efeitos secundários e precauções. Contudo, se o medicamento em causa não se revelar o mais adequado devemos, se possível, sugerir uma alternativa ou, se necessário, recomendar ao utente recorrer ao médico.

### **2.1.8 – Medicamentos Manipulados**

Apesar das inúmeras substâncias ativas e formas farmacêuticas disponíveis no mercado, existem, por vezes, necessidades específicas por parte do utente que não são satisfeitas (como em casos de crianças, insuficientes renais ou doenças específicas). Assim, existe a necessidade, no momento, de preparar uma formulação que não existe comercializada, recorrendo aos medicamentos manipulados, que se definem como qualquer fórmula magistral, preparados segundo uma receita médica que especifica o doente a quem o medicamento se destina, ou preparado oficial, quando o medicamento é preparado segundo indicações compendiais, de uma farmacopeia ou formulário.<sup>1</sup>

Durante o meu estágio, tive a oportunidade de preparar vários medicamentos manipulados diferentes, onde pude não só colocar em prática todo o conhecimento de manipulação galénica previamente adquirido como adquirir novas competências. Para além de um operador, a preparação de um medicamento manipulado requer a presença de um segundo elemento, com a função de supervisor. Este deve assegurar-se que todo o processo decorre conforme as Boas Práticas de Laboratório. Além da manipulação em si, preenchi também a folha de registo do medicamento manipulado, local onde se devem discriminar vários aspetos nomeadamente a identificação do manipulado preparado e respetivas matérias-primas utilizadas (tanto qualitativamente como quantitativamente), o processo de preparação, condições de armazenamento e prazo de utilização, os testes de controlo do produto acabado e respetivo resultado e o cálculo discriminado do preço do medicamento, tendo em consideração os critérios estabelecidos na Portaria n.º 769/2004, de 1 de julho.<sup>2</sup>

Resumindo, os medicamentos manipulados revelam-se como uma grande vantagem para o farmacêutico, que consegue colmatar a inexistência de soluções no mercado atual para alguns utentes.

### **2.1.9 – Medicamentos de Uso Veterinário**

Atualmente, cada vez mais as pessoas se preocupam com os seus animais de companhia, procurando solucionar os seus eventuais problemas de saúde, garantindo a melhor qualidade de vida possível. Deste modo, os medicamentos de uso veterinário têm ganho bastante relevância ao longo dos últimos tempos.

Felizmente, a Farmácia do Forum dispõe de um alargado leque de produtos veterinários, para além de um elevado conhecimento sobre os mesmos, o que me permitiu desenvolver as minhas capacidades de aconselhamento no ramo da veterinária, sendo uma mais-valia no momento do atendimento. Por outro lado, o elevado número de utentes que os procuravam deu-me a possibilidade de passar da teoria à prática em variadas situações.

### **2.1.10 – Outros Produtos de Saúde**

Para além dos medicamentos, a farmácia é também um local de aconselhamento e aquisição de outros produtos, nomeadamente produtos de dermofarmácia e cosmética, de higiene oral e de puericultura, bastante procurados pelos utentes, que cada vez mais se preocupam com a sua beleza, higiene e bem-estar dos seus filhos.

Seja no simples ato de hidratar ou no cuidado mais profundo, no colutório de prevenção ou na pasta dentífrica de tratamento, no leite ou no creme da fralda, pude familiarizar-me com uma gama alargada de marcas destes produtos de saúde e, dentro de cada uma delas, das várias gamas que oferecem, complementando os conhecimentos previamente adquiridos e ainda aumentando bastante as minhas capacidades de aconselhamento nesta vertente.

### **2.1.11 – Conferência do Receituário**

A conferência do receituário constitui uma tarefa de grande importância e envolve uma série de etapas que têm como objetivo minimizar erros associados às receitas, evitando prejuízos para o utente e em termos financeiros.

Esta tarefa inicia-se logo no ato de atendimento, quando recebemos uma receita, devemos sempre confirmar se esta se encontra prescrita corretamente antes de ceder qualquer medicamento que nela conste. No caso das REM's, há que verificar se esta se encontra dentro do prazo de validade, se vem devidamente assinada pelo médico prescriptor e se a impressão no verso corresponde à receita em causa. Caso a receita seja manual, os fatores a ter em conta são acrescidos e, para além dos que já foram acima referidos deve-se também conferir: a identificação do utente (nome, número de utente e, caso seja aplicável, número de beneficiário), vinheta identificativa do médico prescriptor, vinheta identificativa do local de prescrição (facultativo), identificação da exceção que justifica o uso da RM, verificação do regime de comparticipação, identificação do(s) medicamento(s) bem como a quantidade prescrita (tanto em cardinal como por extenso) e se não existem rasuras ao longo da receita.

Após a dispensa da receita, esta é sujeita a revalidação para assegurar que todos os pontos supra referidos foram verificados. Se tudo estiver conforme, a receita é carimbada, datada e assinada. Por fim, as receitas são separadas e organizadas de acordo com o organismo de comparticipação a que pertencem e em lotes de 30 receitas, nos casos aplicáveis.

Considerei a minha participação nesta tarefa bastante importante para a minha formação, não só consolidei os conhecimentos referentes às receitas mas também fiquei a conhecer os

diferentes organismos de comparticipação existentes para além do sistema nacional de saúde e como se desenrola o processo de faturação às diversas entidades.

### **2.1.12 – Conferência das Validades dos Produtos**

É fundamental que se faça o controlo dos prazos de validade de todos produtos existentes na farmácia. Todos os meses é realizada a conferência do prazo de validade dos produtos, através da definição de uma data limite de validade e consequente emissão por parte do Sifarma 2000<sup>®</sup> de uma lista onde constam todos os produtos englobados no limite previamente definido, seguindo-se a conferência dos mesmos. Por último, no caso de o prazo de validade de um produto terminar dentro de três meses, o mesmo é devolvido ao fornecedor.

Deste modo, torna-se possível salvaguardar a segurança do utente e diminuir os prejuízos, daí esta tarefa ser de extrema importância.

### **2.1.13 – Realização de Inventário**

Como referido anteriormente, a gestão e manutenção dos *stocks* representa uma grande importância para a farmácia, pois é essencial que se tenha conhecimento, a qualquer momento, do que realmente se encontra no local, tanto para a otimização do espaço de armazenamento como para se obter a melhor rentabilidade possível. Para tal é crucial que o *stock* indicado pelo Sifarma 2000<sup>®</sup> coincida com o *stock* real, nascendo assim a necessidade de, periodicamente, se realizar inventário da farmácia, onde se confirma tal facto e se corrige eventuais erros de *stock*.

No decorrer do meu estágio, tive a oportunidade de participar na realização do inventário da farmácia. A atividade consistiu em contabilizar, referência a referência, todos os produtos existentes na farmácia e posteriormente confrontar esta contabilização com o *stock* indicado pelo Sifarma 2000<sup>®</sup>. Deste modo, pude vivenciar tanto a experiência da realização de um inventário como também assistir e integrar na dinâmica necessária para o efeito, considerando assim um ponto forte do meu estágio.

Dada a dimensão da atividade e da logística necessária, esta decorreu fora do horário de atendimento ao público. Mais uma vez destaco o empenho e dedicação da equipa técnica, sempre com um espírito de entajuda exemplar.

### **2.1.14 – Determinação de Parâmetros Bioquímicos e Fisiológicos**

Para além de um espaço de cedência e aconselhamento de produtos de saúde, a farmácia oferece também serviços farmacêuticos, nomeadamente de *check-up*, onde se incluem a

medição da pressão arterial, glicémia, colesterol total e triglicéridos. Estas são realizadas no gabinete de apoio ao utente, de modo a permitir uma maior privacidade, facilitando o diálogo com o utente.

Estas determinações representam uma mais-valia para o utente, não só pela determinação dos valores em si mas principalmente pelo aconselhamento não-farmacológico perante o valor apresentado, que por vezes é suficiente para controlar os parâmetros, evitando idas desnecessárias ao médico ou o uso precoce de medidas farmacológicas. Para além disso, através do diálogo com o utente, é possível perceber a medicação que este costuma fazer, se a faz corretamente e, em caso negativo, tentar perceber a razão e de que modo se poderia corrigir.

Durante o meu estágio tive não só a oportunidade de determinar vários parâmetros mas também de desenvolver competências relacionadas com o diálogo com o utente, o que me ajudou no momento do atendimento, e de consolidar e adquirir novos conhecimentos adquiridos na área do aconselhamento não farmacológico e da revisão da terapêutica.

### **2.1.15 – Plano Curricular do MICF**

O MICF compreende várias áreas do saber, incluindo ciências físico-químicas, ciências biológicas e biomédicas e ciências farmacêuticas, o que permite aos estudantes uma formação aprofundada e abrangente, reunindo as ferramentas necessárias para o desenvolvimento de um profissional de excelência.

Ao longo dos últimos quatro anos e meio, várias unidades curriculares forneceram ferramentas importantes para o estágio em farmácia comunitária, como é o caso de “Intervenção Farmacêutica em Auto-cuidados de Saúde e Fitoterapia” (IFASF), que nos dota de conhecimentos importantes para o aconselhamento farmacêutico. De salientar também a unidade curricular “Farmácia Clínica”, que desenvolveu competências a nível de avaliação e revisão da terapêutica, que se revelou bastante útil no diálogo com os utentes.

## **2.2 – Pontos Fracos**

### **2.2.1 – Plano Curricular do MICF**

Apesar das várias vantagens, o plano curricular do MICF apresenta também, na minha opinião, algumas lacunas. Penso que o programa de algumas unidades curriculares não se adequa à realidade exigida na farmácia comunitária, nomeadamente o de “Dermofarmácia e Cosmética” e “Preparações de Uso Veterinário”.

No primeiro caso, o programa foca-se bastante no detalhe pormenorizado da pele e na deteção das suas afeções e, apesar de abordar vários tipos de produtos dermofarmacêuticos, descarta o aconselhamento farmacêutico dos mesmos. Apesar de ter sido abordado em IFASF, o tempo dispensado foi demasiado curto dado a quantidade de afeções dermatológicas diferentes e os fatores a considerar em cada caso.

No segundo caso, mais uma vez não é dada prioridade ao aconselhamento farmacêutico, visto que o programa centra-se na farmacocinética e farmacodinâmica de vários fármacos de uso veterinário e suas diferenças entre espécies de animais que, embora sejam importantes, não são suficientes no momento do atendimento.

De salientar também que a unidade curricular IFASF deveria ser lecionada separadamente, dado que desta forma seria possível abordar de um modo mais aprofundado certas áreas de atuação farmacêutica como puericultura, suplementos alimentares e higiene oral que, na minha opinião, não foram exploradas devidamente.

Estas falhas foram colmatadas com o grande apoio da equipa técnica da farmácia e com as formações que tive oportunidade de participar.

### **2.2.2 – Receitas Manuais**

Seja por falência informática, inadaptação do prescritor, prescrição no domicílio ou outras situações, num máximo de quarenta receitas por mês, em várias situações aparecem RM. Estas receitas podem causar bastantes dificuldades no atendimento, uma vez que na maior parte das situações, foi complicado entender a caligrafia e, conseqüentemente, perceber o que havia sido prescrito. Nestes casos é imprescindível um maior cuidado, pois uma má compreensão pode levar a dispensa de medicação errada, prejudicando gravemente o utente. Uma vez mais, o apoio da equipa técnica foi essencial para ultrapassar este obstáculo.

### **2.2.3 – Dispensa Automatizada**

O uso do robot na farmácia traz bastantes vantagens, como já referido anteriormente. Contudo, com o uso da dispensa automatizada e apesar do grande contato que tive com os produtos nas atividades relacionadas com as encomendas, o processo de associação dos princípios ativos aos nomes comerciais e às próprias embalagens demorou mais tempo, uma vez que não era necessário ir em busca das embalagens dado que o robot dispensava a grande maioria delas.

## **2.3 – Oportunidades**

### **2.3.1 – Formações**

No decorrer do meu estágio, tive a oportunidade de participar em várias formações, tanto internas como externas. Estas, normalmente promovidas pelos delegados de informação médica, serviram não só para apresentar produtos novos como também para relembrar a equipa técnica de alguns produtos já em circulação, enaltecendo as vantagens do seu aconselhamento, partilhando opiniões e esclarecendo alguma dúvida existente. Deste modo, foi uma excelente oportunidade para o meu estágio, onde adquiri bastantes conhecimentos, nomeadamente a nível de cosmética, veterinária e higiene oral, podendo destacar, a nível interno, as formações das linhas da Uriage<sup>®</sup>, ROC<sup>®</sup>, Eucerin<sup>®</sup>, Filorga<sup>®</sup>, SVR<sup>®</sup>, Aveeno<sup>®</sup>, Bayer Vet<sup>®</sup> e Dentaïd<sup>®</sup>.

A nível externo, algumas marcas promovem formações mais abrangentes, num local combinado e destinadas a várias farmácias. Saliento duas formações por parte da marca ISDIN<sup>®</sup> e uma por parte da marca Galderma<sup>®</sup>. De notar também a oportunidade de participar no programa “Pernas para Andar”, promovido pelo Grupo Tecnimede<sup>®</sup>, onde pude aprender bastante sobre doença venosa crónica e meios para atuar sobre a mesma.

### **2.3.2 – Serviços Permanentes**

As farmácias cumprem, de 20 em 20 dias, horário de serviço, onde ficam de prevenção durante toda a noite, com o objetivo de suprimir eventuais necessidades por parte dos utentes. A gama de atendimentos feita em horário normal e em horário de serviço são bastante distintos: enquanto que em horário normal a medicação cedida se baseia mais em manutenção de situações crónicas, no horário de serviço os medicamentos mais prescritos destinam-se ao tratamento de situações agudas. Assim, ao estagiar em ambos os horários, pude contactar com diferentes realidades que exigem necessidades de aconselhamento distintas.

### **2.3.3 – Consultas de Nutrição**

A Farmácia do Forum dispõe, semanalmente, de consultas de nutrição, onde os utentes podem receber aconselhamento e medidas a adotar tendo em visto o controlo do seu peso, da melhor alimentação a fazer e de um melhor estilo de vida. Para complementar estas consultas, estão a disposição dos utentes vários produtos que os ajudam nos objetivos estabelecidos. Como tal, estas consultas revelaram-se como uma boa oportunidade de

contactar, adquirir conhecimentos e aconselhar da melhor maneira estes produtos, sendo uma oportunidade relevante no meu estágio.

#### **2.3.4 – Eventos de marcas com presença de respetivas conselheiras**

Enquanto estive a estagiar na Farmácia do Forum, esta foi alvo de vários eventos promovidos por diversas marcas, como por exemplo, Caudalie®, Esthederm®, Lierac® e Uriage®. Estas tinham como objetivo aproximar-se dos utentes e promover a marca junto dos mesmos, muitas vezes realizando uma avaliação inicial, seguido de um aconselhamento personalizado com base no resultado obtido.

Estes eventos foram uma boa oportunidade para o meu estágio na medida em que no decurso do evento, eu contactava mais com as gamas das marcas em questão e deste modo aprofundava os meus conhecimentos sobre as mesmas.

### **2.4 – Ameaças**

#### **2.4.1 – Parafarmácias**

Dado que a Farmácia do Forum se situa no centro comercial Fórum Coimbra, encontra-se perto de um hipermercado onde se encontra uma parafarmácia associada. Sabendo que esta compete com a farmácia a nível de preços e campanhas, representa uma ameaça para o meu estágio. Para além do mais, os descontos associados ao hipermercado aliciam as pessoas a adquirir produtos, como MNSRM e produtos de cosmética, na parafarmácia. No entanto, apesar de ter alguns produtos em comum com a farmácia, o atendimento prestado em nada se compara, não sendo adequado em muitas situações, podendo constituir um risco para a saúde do utente.

Contudo, e apesar da competitividade instalada, a qualidade do atendimento e o profissionalismo demonstrado por toda a equipa técnica contraria bastante esta situação, permitindo que muitos utentes passem a ser clientes habituais.

#### **2.4.2 – Prescrição por DCI**

A partir do momento que a prescrição começou a ser feita por Denominação Comum Internacional (DCI), esta uniformizou-se e deu a possibilidade ao utente de poder escolher entre o medicamento de marca e o medicamento genérico. Contudo, este é um aspeto que muitas vezes não é entendido pelos utentes, dado que quando são questionados se preferem o medicamento de marca ou genérico, respondem que querem especificamente o que foi prescrito pelo médico. Nestas situações, era explicado que o médico prescrevia por

princípio ativo e que era o utente que escolhia qual das opções queria levar, apresentando várias opções possíveis e respetivos preços. Apesar dos esclarecimentos prestados, uma grande percentagem destes utentes continuavam a insistir que queriam o que havia sido prescrito, o que dificultava o atendimento. Felizmente, através da ficha do utente presente no Sifarma 2000<sup>®</sup> permitia aceder ao histórico da medicação do utente, caso este fosse um utente habitual, e perceber qual era o medicamento indicado. Caso o utente não fosse habitual, tentava, através do diálogo e da apresentação de algumas embalagens, chegar à conclusão de qual era a medicação pretendida.

### **2.4.3 – Informação relativa ao preço máximo do medicamento constante na guia de tratamento**

Nas RSP encontra-se, para cada MSRM prescrito, uma indicação do preço máximo a suportar pelo utente, dando informação ao mesmo do valor da prescrição em causa. Contudo, esta informação gera, em alguns casos, bastante confusão, uma vez que o preço apresentado é relativo ao medicamento genérico correspondente (quando aplicável) mais barato e muitas vezes os utentes não compreendem desse modo. Para além disso, dada a frequente alteração de preços e comparticipações dos medicamentos, a informação constante na receita nem sempre se encontra atualizada pelo que, mesmo cedendo o medicamento genérico mais barato, o preço a suportar pelo utente pode não corresponder ao constante na receita, resultando por vezes em situações de conflito que podem gerar constrangimentos no momento do atendimento e que devem ser geridos da melhor forma possível.

## **3 – Casos Clínicos**

### **3.1 – Caso Clínico I**

Uma utente chegou à farmácia procurando aconselhamento para o seu filho bebé, referindo que apresentava a zona da fralda bastante vermelha derivada de fezes ácidas. Perguntei se estava a aplicar algum produto até à data, ao que a utente respondeu que estava a utilizar o Halibut Derma<sup>®</sup> creme muda fraldas, mas que não estava a surtir efeito. Assim, questionei a utente se notava pontos brancos na assadura ou se estava realmente só vermelho, ao que me respondeu que “de facto notei uns pontinhos brancos”. Pela descrição obtida, o cenário mais provável seria uma candidíase na zona da fralda. Deste modo, aconselhei o uso de Nutraisdin AF<sup>®</sup>, que contém miconazol, um antifúngico, associado a

óxido de zinco e dexpanthenol, que acalmam a vermelhidão, durante sete dias, tendo o cuidado de aplicar na pele bem limpa e seca.<sup>3</sup> Posteriormente, a utente perguntou também se haveria algo da mesma linha para a manutenção da pele do bebé, aconselhei Nutraisdin Happy<sup>®</sup>, com dexpanthenol, óxido de zinco e óleo de borragem, ideais para o cuidado diário da zona da fralda do bebé, restaurando a função barreira da mesma.<sup>4</sup>

### **3.2 – Caso Clínico 2**

Um utente dirigiu-se à farmácia, notoriamente incomodado, apresentando os seguintes sintomas: congestão nasal com corrimento associado, espirros frequentes, garganta irritada e comichão nos olhos, lacrimejando com alguma frequência. Dado que o caso se deu no início de Abril, questionei se era sensível a pólenes que, nesta altura do ano, estão presentes em maior quantidade, pelo que a resposta do utente foi “provavelmente sim, até porque me sinto bem pior no exterior do que aqui dentro”. Assim, a conclusão mais provável seria uma reação alérgica, aconselhando de forma a suprimir os sintomas apresentados. Para o nariz recomendei o uso de Flonaze<sup>®</sup>, num spray nasal indicado para o alívio dos sintomas causados pela reação alérgica, aplicando uma vez por dia. Adverti que, dado que contém um derivado da fluticasona, um corticosteróide, não deveria ser usado por longos períodos de tempo e, caso os sintomas persistissem ao fim de sete dias, deveria consultar um médico. Uma vez que o spray pode demorar três a quatro dias a atingir o efeito máximo e que o utente se encontrava bastante transtornado, decidi complementar com Allergodil<sup>®</sup> colírio, uma gota em cada olho de manhã e à noite, para acalmar a irritação ocular, tendo o cuidado de me informar se o utente estava a tomar mais algum medicamento de uso ocular ou se usava lentes de contacto, pois o colírio poderia interferir com ambos. Recomendei também Telfast 120<sup>®</sup>, um comprimido por dia, que ao conter um anti-histamínico, iria também auxiliar à resolução do quadro sintomatológico do utente.<sup>5; 6; 7</sup>

#### **4 – Considerações Finais**

O estágio curricular em farmácia comunitária é, de facto, essencial ao MICEF, pois não só permite aos estudantes colocar em prática os conhecimentos adquiridos na formação académica como também desenvolver novas aptidões e competências.

Pela comparação de pontos fortes e pontos fracos apresentados, é evidente que a minha experiência foi excelente, acima de tudo pela equipa técnica que me acompanhou desde o primeiro dia. Apesar de por vezes o trabalho ser árduo, tanto pelas tarefas a desenvolver como pela quantidade e heterogeneidade de utentes, acaba por também ser desafiante e gratificante, na medida em que no final do dia sabemos que contribuimos para a melhoria da qualidade de vida das pessoas, que no fundo, é o nosso objetivo como profissionais de saúde.

Com o estágio desenvolvido na Farmácia do Forum, cresci não só a nível profissional mas também a nível pessoal, ficando com a noção de, com todas as atividades desenvolvidas e atendimentos efetuados, que a formação é constante, aprendendo todos os dias algo novo.

Em suma, a profissão do farmacêutico não se limita à dispensa de medicamentos, é um agente de saúde pública e um pilar na promoção do uso racional do medicamento. Contudo, há que apontar a falta de reconhecimento do nosso valor mas através do nosso conhecimento, aconselhamentos, serviços prestados e dedicação, acredito firmemente que conseguiremos ter um papel ainda mais ativo na saúde e bem-estar da sociedade.

João Paulo Braz Pires Leitão Abreu

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

Relatório de Estágio referente à Unidade Curricular “Estágio Curricular”, sob a orientação da Dr.<sup>a</sup> Mariana Cássio de Sousa Mergulhão Pêra, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## **Lista de Abreviaturas**

- CQ – Controlo de Qualidade
- GC – Cromatografia em Fase Gasosa (do inglês: *Gas Chromatography*)
- HPLC – Cromatografia em Fase Líquida de Alta Performance (do inglês: *High-Performance Liquid Chromatography*)
- IPC – *In Process Control*
- Labialfarma S.A. – Labialfarma – Laboratório de Produtos Farmacêuticos e Nutracêuticos, S.A.
- MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
- MP – Matérias-Primas
- SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

## I – Introdução

Para além da farmácia comunitária, o farmacêutico é indispensável em várias outras áreas, nomeadamente na indústria farmacêutica. Como profissional do medicamento, é natural que este desempenhe um papel preponderante seja no desenvolvimento galénico, na produção ou no controlo de qualidade. Assim é fundamental para nós, estudantes do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), obter uma visão o mais ampla possível dos vários locais de atuação do farmacêutico assim como das várias fases do circuito do medicamento, tendo como objetivo a formação de profissionais versáteis, com capacidade de resposta às diversas necessidades do mercado de trabalho.

Deste modo, uma vez que a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra permite aos seus estudantes a realização de um segundo estágio, decidi realizar um estágio na indústria farmacêutica Labialfarma – Laboratório de Produtos Farmacêuticos e Nutracêuticos, S.A. (Labialfarma S.A.), no departamento de Controlo de Qualidade (CQ), que decorreu entre 2 de maio de 2017 e 4 de agosto de 2017, sob orientação técnica da Dr.<sup>a</sup> Mariana Cássio de Sousa Mergulhão Pêra.

O grupo Labialfarma inclui, para além da empresa-mãe, mais quatro unidades na mesma área: a *Gesconsulting – Serviços Especializados de Gestão, Lda.*; a *LiqFillcaps International – Innovative Pharmaceutical Products, Lda.*; *Nutri.add Healthcare Advanced Solutions, Lda.* e a *Wellcare Packaging Lda., Teas & Infusions.*<sup>8</sup>

Fundada em 1981, a Labialfarma S.A. encontra-se localizada em Felgueira, concelho de Mortágua, distrito de Viseu, sendo constituída atualmente por cerca de trezentos colaboradores. A indústria é um *contract manufacturer*, que fabrica exclusivamente para terceiros, quer nacionais como internacionais, oferecendo um vasto leque de serviços, desde do desenvolvimento galénico e a conceção do produto ao *design* e fabrico das embalagens, e respetivos controlos de qualidade.<sup>8</sup>

O departamento de controlo de qualidade detém uma importância extrema em qualquer empresa, uma vez que este assegura que todos os lotes de todos produtos cumprem todos os critérios exigidos aos vários níveis, respeitando os padrões de qualidade estabelecidos. Na Labialfarma S.A., este departamento encontra-se dividido nas seguintes secções: análises cromatográficas, englobando a Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e a Cromatografia em Fase Gasosa (GC), análises do material de embalagem, incluindo todo o material de acondicionamento primário e secundário, análises de matérias-primas (MP), com uma secção dedicada às que são à base de plantas e análises microbiológicas. O departamento de CQ conta ainda com uma secção de *In Process Control* (IPC), responsável

por certificar a conformidade dos produtos com as especificações estabelecidas durante o processo de produção.

O relatório do presente estágio encontra-se sob a forma de análise *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats* (SWOT), onde apresento de forma sucinta os aspetos positivos e negativos, na dimensão interna e externa, com o objetivo de desenvolver uma análise crítica ao meu estágio, tendo em conta as atividades desenvolvidas e os conhecimentos adquiridos no decorrer do mesmo.

## **2 – Análise SWOT**

### **2.1 – Pontos Fortes**

#### **2.1.1 – Equipa Técnica**

No primeiro dia de estágio, fui recebido pelo departamento dos Recursos Humanos, que me apresentou a história e o modo de funcionamento da empresa, tendo um primeiro contato com a mesma. Após percorrer alguns espaços comuns da empresa, foi-me apresentado o departamento de CQ, onde fiquei a conhecer todos os colaboradores das diferentes secções acima mencionadas. No decorrer do meu estágio, a equipa técnica foi um ponto forte uma vez que toda ela se mostrou disposta a esclarecer qualquer dúvida que surgisse no decorrer das atividades assim como fomentou o meu espírito crítico, incentivando a interpretar os resultados obtidos e retirar respetivas conclusões.

#### **2.1.2 – Higiene e Segurança no Trabalho**

Ainda no primeiro dia de estágio, foi-me dada uma formação acerca da política de higiene e segurança no trabalho instaurada na empresa. Aí, pude aprender acerca da importância da sua presença, assim como os procedimentos a ter conta aquando o acesso ao local de trabalho. Cada colaborador possui um conjunto de fardas constituídas por calças, túnica, socas, touca, capuz e luvas. Para além do uso de farda, há também que respeitar os limites das áreas branca (limpa) e cinzenta (suja) de modo a evitar ao máximo possíveis contaminações que possam afetar o produto final.

Existem ainda vários avisos de segurança acerca da tarefa a realizar, assim como dos vários reagentes utilizados, sendo os colaboradores regularmente informados sobre atualizações nos procedimentos de higiene e segurança no trabalho, estando ainda sujeitos a uma consulta médica anual, com o objetivo de rastrear eventuais problemas de saúde, como por exemplo, doenças respiratórias. Assim, tornou-se possível realizar todas as atividades que me foram propostas da forma mais segura possível, diminuindo ao máximo a probabilidade de ocorrência de danos próprios, a terceiros e materiais.

#### **2.1.3 – Variedade de Análises e Procedimentos**

O meu estágio iniciou-se na secção de análise de MP, onde todos os lotes adquiridos são submetidos a vários ensaios tendo em vista a conferência dos padrões de qualidade estabelecidos. Aqui destaca-se a grande variedade de MP analisadas, incluindo princípios ativos e excipientes, e de ensaios realizados. Cada MP recebida engloba um conjunto de

análises que, por norma, dizem respeito à sua identificação, identificação de impurezas e doseamento, entre outros, cujas especificações e critérios de aceitação se encontram nas farmacopeias portuguesa, europeia e/ou americana, dependendo do que estiver a ser analisado. Após a primeira análise, que contempla todos os ensaios prescritos, os lotes são ainda sujeitos a reanálises periódicas, de forma a garantir a sua estabilidade e conformidade.

Durante o meu período nesta secção, realizei vários testes como aspeto da MP e respetiva comparação com um lote previamente aprovado, solubilidade, densidade relativa, cromatografia em camada fina e identificação de grupos funcionais presentes na substância a analisar, tendo em vista a autenticidade da matéria recebida. Por outro lado, é igualmente importante verificar que o lote não se encontra degradado e/ou contaminado. Neste contexto, realizei testes como identificação de impurezas específicas, como produtos de degradação, e de impurezas gerais, como metais pesados e outros iões, tanto por métodos químicos como cromatográficos. De salientar ainda a determinação de vários índices químicos em MP lipídicas, como o índice de hidroxilo e o índice de peróxido, de forma a identificar grupos funcionais específicos nas amostras e garantir o bom estado de conservação das mesmas, respetivamente. No que diz respeito ao doseamento da MP, este pode ser feito recorrendo a várias técnicas, nomeadamente por titulações ácido-base, iodométricas, complexométricas, retrotitulações, espectroscopia Ultra Violeta-Visível e métodos cromatográficos. Por último, realizei outros tipos de testes como a determinação da percentagem de água presente na amostra, através do método de Karl-Fischer, e de outros compostos voláteis e termicamente degradáveis, por perda por secagem e por calcinação, determinação de pH, condutividade, viscosidade, ensaios de dissolução e uniformidades de tamanho e de massa. De salientar que apesar do meu primeiro contacto com os métodos e ensaios acima referidos ter sido na secção de análise de MP, a maioria destes também se aplicam a misturas intermédias e a produtos acabados, de modo a garantir a qualidade nas diferentes etapas de produção.

Posteriormente, frequentei a secção de análises cromatográficas, onde contactei intensivamente com as técnicas de HPLC e GC. Aqui não só efetuei identificações e doseamentos de MP por HPLC e GC, de acordo com as respetivas monografias constantes nas farmacopeias, como também de produtos acabados, alargando o meu conhecimento sobre o portefólio de formulações da empresa. Com a autonomia que me foi conferida na operação dos equipamentos e o apoio constante da equipa do setor, pude também familiarizar-me com o *software* de gestão dos equipamentos, através do qual se definem os vários parâmetros analíticos, como o fluxo gerado pelas bombas, a temperatura do forno, o volume de injeção da amostra, o tempo de corrida e o comprimento de onda emitido pelo

detetor, se constroem as sequências de análise e se interpretam os cromatogramas obtidos. Para além disso, fui também incentivado a preparar as soluções necessárias, tanto os padrões e amostras como as fases móveis e montar as colunas cromatográficas nos equipamentos.

Deste modo, uma análise cromatográfica compreende os seguintes passos:

- Definição do método de análise e respetivos parâmetros analíticos;
- Preparação das soluções a analisar e da fase móvel;
- Montagem da coluna cromatográfica adequada e preparação do equipamento com a purga do equipamento, lavagem inicial e acondicionamento da coluna;
- Injeção única (*single*) dos padrões e amostras;
- Construção e corrida da sequência de análise;
- Integração e interpretação dos cromatogramas obtidos.

Caso a análise efetuada seja qualitativa, procede-se à comparação dos tempos de retenção do(s) padrão(ões) com os tempos das amostras respetivos. Perante uma análise quantitativa, para além do procedimento anterior compara-se também as áreas sob os picos, doseando a amostra com base nestas e na concentração teórica do(s) padrão(ões), dado que existe uma relação de proporcionalidade direta entre a área do pico e a concentração do composto analisado. Por norma, a amostra é preparada em duplicado e todas as injeções são repetidas três vezes. A análise é válida quando o desvio padrão relativo de repetibilidade não excede 2% e os resultados de todas as injeções se encontram dentro dos limites de aceitação. De salientar ainda que, durante a frequência nesta secção, pude também realizar ensaios de estabilidade em lotes de produtos acabados.

Assim, considero que o vasto leque de ensaios e procedimentos com que contactei, bem como a variedade de produtos e MP analisadas foi um ponto forte do meu estágio, que me permitiu consolidar os conhecimentos previamente adquiridos e a aquisição de novas competências.

#### **2.1.4 – Bom Domínio da Língua Inglesa**

Vários testes que realizei no departamento de CQ tinham como base bibliográfica a farmacopeia europeia ou a farmacopeia americana, sendo que ambas se encontram redigidas em inglês, assim como o *software* de gestão dos equipamentos de HPLC e GC, e a maioria dos certificados de análise dos fornecedores, entre outros documentos. Posto isto, o domínio desta língua tornou-se imprescindível para o correto e eficaz desempenho das atividades propostas, com uma realização mais célere das mesmas do que seria na falta de conhecimentos de inglês.

### **2.1.5 – Registo de Operações**

No departamento de CQ, é efetuado o registo rigoroso de todas as atividades desenvolvidas, desde a preparação de soluções gerais a serem utilizadas nos ensaios e de fases móveis e a utilização dos diversos equipamentos que o departamento dispõe até aos métodos executados, pesagens e cálculos efetuados e resultados obtidos. Tanto as soluções gerais como as fases móveis são registadas em livros de registo separados, onde é anotado:

- O nome da solução ou fase móvel, com a atribuição de um lote interno;
- Os reagentes usados na sua preparação, incluindo os respetivos fabricantes, lotes, quantidades usadas e identificação do equipamento utilizado para a quantificação;
- Observações importantes, como acertos de pH, indicando o valor obtido;
- Data da preparação e assinatura do colaborador.

Quanto aos equipamentos, cada um dispõe de uma folha de registo diário onde consta a data de utilização, o que foi analisado e respetivo lote, a operação realizada, observações e assinatura do operador. Por último, todos os ensaios executados por cada colaborador são registados em cadernos de laboratório individuais, anotando os reagentes utilizados com respetivo fabricante e lote, pesagens e cálculos efetuados e resultados obtidos. De salientar ainda que todos os reagentes e materiais que chegam ao departamento de CQ são igualmente registados.

Deste modo, é permitido uma rápida e fácil consulta de tudo o que foi realizado, agilizando processos. Todo este rigor e nível organizacional ajudaram-me a desenvolver as tarefas propostas de uma forma mais rápida e eficaz, aumentando a minha eficiência e produtividade.

### **2.1.6 – Adaptação Curricular**

Como já referido anteriormente, durante todo o meu estágio na Labialfarma S.A., abordei várias técnicas e procedimentos, bem como uma vasta variedade de ensaios, o que exige conhecimentos base dos mesmos. Por outro lado, também preparei inúmeras soluções e fases móveis e operei vários equipamentos, requerendo da minha parte destreza na manipulação do material de laboratório.

O plano curricular do MICF oferece um alargado conjunto de conhecimentos e competências, teóricas e práticas, contemplando várias áreas do saber. Ao longo dos últimos quatro anos e meio foi-nos transmitido não só conhecimentos referentes à maioria dos testes que realizei, mas também bastante prática com o diverso material de laboratório existente. De destacar as unidades curriculares “Métodos Instrumentais de Análise I” e

“Métodos Instrumentais de Análise II”, onde foram abordados os fundamentos teóricos de vários métodos eletroquímicos, espectroscópicos e cromatográficos, assim como o funcionamento dos equipamentos associados, e realização de trabalhos práticos recorrendo aos mesmos. De salientar ainda a unidade curricular “Farmacognosia”, na qual adquiri conhecimentos sobre os índices químicos realizados em compostos lipídicos, e as várias unidades curriculares de Tecnologia Farmacêutica, em que não só foram abordados alguns ensaios realizados em IPC, como ensaios de dissolução e uniformidades de tamanho e massa, mas também ensaios de estabilidade.

Deste modo, considero que todo o conhecimento teórico e prático adquirido no curso e a sua adaptação às atividades que desenvolvi durante o período de estágio foram essenciais para um bom desempenho das atividades propostas, permitindo alguma autonomia desde o início do estágio.

## **2.2 – Pontos Fracos**

### **2.2.1 – Duração do Estágio**

O meu estágio teve a duração de três meses, num total de quatrocentas e noventa e seis horas. Apesar de já existir alguma autonomia desde o início do estágio, considero que a duração do mesmo não foi suficiente para cobrir toda a variedade de produtos sujeitos a análise e ensaios realizados no departamento de CQ. Por outro lado, alguns procedimentos de análise eram bastante complexos e específicos, pelo que requereram algum tempo para os compreender e executar em pleno.

Deste modo, a altura em que demonstrei um maior nível de autonomia e domínio das tarefas a realizar coincidiu com o término do estágio, considerando a duração do mesmo reduzida.

### **2.2.2 – Abrangência do Estágio**

Como já referido anteriormente, o departamento de CQ da Labialfarma S.A. é constituído pelas secções de análises cromatográficas, análises do material de embalagem, análises de MP, análises de MP à base de plantas, análises microbiológicas e IPC. Apesar de me terem sido apresentadas todas estas secções, apenas frequentei as secções de análises de MP e de análises cromatográficas, não tendo tido oportunidade de realizar atividades relacionadas com o material de embalagem e com a microbiologia. Por outro lado, também não contactei com outros departamentos da empresa, como a produção de sólidos ou a produção de líquidos. Contudo tive a oportunidade de, no âmbito da realização de ensaios

de estabilidade, visitar as câmaras de estabilidade, onde se encontram os produtos sujeitos aos ensaios referidos, nas respetivas condições de conservação estabelecidas.

Assim, caso o estágio fosse mais abrangente, poderia ter ficado com uma visão mais ampla tanto do departamento de CQ, como da indústria em si, desenvolvendo uma melhor perceção da totalidade das funções e atividades desempenhadas pelo farmacêutico na indústria farmacêutica.

## **2.3 – Oportunidades**

### **2.3.1 – Visitas e Auditorias**

A Labialfarma S.A. é alvo de visitas, nomeadamente de clientes e futuros clientes, que veem em primeira mão as instalações, atividades e políticas estabelecidas na empresa. Dado a política de higiene e segurança no trabalho instaurada, as visitas preparam-se para a entrada nas zonas limpas, com o uso de batas descartáveis, touca, protetores de calçado descartáveis e apara-barbas, quando aplicável.

Para além das visitas, todas as empresas do setor farmacêutico são sujeitas a auditorias regulares, sendo as indústrias farmacêuticas aquelas que são auditadas de uma forma mais aprofundada. O INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. tem como missão “regular e supervisionar os sectores dos medicamentos de uso humano e dos produtos de saúde, segundo os mais elevados padrões de proteção da saúde pública, e garantir o acesso dos profissionais da saúde e dos cidadãos a medicamentos e produtos de saúde de qualidade, eficazes e seguros”, de acordo com o Decreto-Lei nº 46/2012 de 24 de fevereiro do Ministério da Saúde, assumindo-se assim como a entidade regulamentar máxima da área do medicamento em Portugal.<sup>9</sup> Deste modo, a Labialfarma S.A. é naturalmente sujeita a auditorias regulares por parte deste organismo. Por outro lado, a empresa é também auditada diretamente pelos seus clientes ou por empresas subcontratadas pelos mesmos.

No decorrer do meu estágio, pude presenciar tanto visitas como auditorias, apercebendo-me do modo como estas se processam, considerando uma boa oportunidade do mesmo, dado que até à data apenas sabia da sua existência.

### **2.3.2 – Variedade de Profissionais**

Qualquer indústria farmacêutica não depende exclusivamente de farmacêuticos para o seu bom funcionamento, necessitando de uma equipa multidisciplinar para alcançar o sucesso desejado. Desta forma, contactei com profissionais de várias áreas de formação para além de

farmacêuticos, como engenheiros, bioquímicos, biólogos, microbiologistas e técnicos de laboratório. Esta variedade de formações revelou-se uma ótima oportunidade não só de trocar ideias e opiniões, dotando-me de vários conhecimentos, mas também de estabelecer novos e diversos contactos.

## **2.4 – Ameaças**

### **2.4.1 – Localização do Estágio**

Como já referido anteriormente, a Labialfarma S.A. encontra-se situada em Felgueira, concelho de Mortágua e distrito de Viseu. Este local dista cerca de cinquenta e nove quilómetros de Coimbra, sendo o Itinerário Principal nº3 o acesso rodoviário mais próximo. Ainda assim, a empresa situa-se aproximadamente a vinte quilómetros deste acesso. Deste modo, as viagens de ida e volta diárias provocaram bastante cansaço, havendo um esforço acrescido para não haver perda de produtividade.

### **3 – Considerações Finais**

O farmacêutico, especialista do medicamento, desempenha também outras funções em ambiente de indústria, como as de gestor e líder de equipa, solucionando vários problemas que se encontrem no caminho da obtenção de produtos de excelência.

Concluído o meu estágio na Labialfarma S.A., considero que este foi um forte contributo não só para o meu crescimento profissional mas também pessoal. Sendo este estágio o meu primeiro contacto com a indústria farmacêutica, não estava inteiramente ciente do ambiente real diário da mesma. Contudo, através de todas as vivências e atividades realizadas, consegui ter uma melhor perceção do papel do farmacêutico neste setor de atividade, principalmente no âmbito do controlo de qualidade, além de cimentar conhecimentos previamente adquiridos assim como adquirir novas competências.

Em suma, o meu estágio curricular no departamento de CQ da Labialfarma S.A. foi uma experiência essencial para a minha consciencialização deste ramo do setor farmacêutico, alargando a minha visão do mercado de trabalho.

João Paulo Braz Pires Leitão Abreu

**Microbiota Intestinal: Da Disbiose à Doença Extra-  
Intestinal**

Monografia referente à Unidade Curricular “Estágio Curricular”, sob a orientação da Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## **Resumo**

O ser humano é colonizado por um elevado número de bactérias, superior ao número de células humanas que o constitui, que se distribuem por todo o organismo formando, conjuntamente com outros microrganismos, a microbiota. O trato gastrointestinal destaca-se por acolher um maior número e variedade de bactérias e por representar um dos locais de maior interação entre o organismo e o ambiente envolvente.

Fatores como a dieta e a administração de fármacos, entre outros, podem influenciar a constituição e diversidade da microbiota intestinal. Esta perturbação na homeostase, se suficientemente significativa, pode induzir um estado de disbiose que, através da ação de componentes e metabólitos bacterianos e/ou do sistema imunitário do hospedeiro, tem um papel de grande importância na patogénese e desenvolvimento de várias doenças extra-intestinais.

No presente documento, é feita uma abordagem geral da microbiota intestinal e da relação dos vários tipos de disbiose com doenças extra-intestinais, nomeadamente a nefrolitíase, o síndrome do fígado gordo não-alcoólico e a asma, assim como das terapias atuais e desafios futuros.

## **Palavras-Chave**

Microbiota Intestinal, Disbiose, Doenças Extra-Intestinais, Nefrolitíase, Síndrome do Fígado Gordo Não-Alcoólico, Asma.

## **Abstract**

The human organism is colonized by a large number of bacteria, surpassing the number of existing human cells, forming, alongside other microorganisms, the microbiota. The gastrointestinal tract stands out from the remaining body structures as it harbors numerous and diversified bacteria and constitutes one of the largest interfaces between the host and the surrounding environment.

Variables such as diet and drugs, among others, may alter the composition and diversity of the gut microbiota. Should the perturbation of the homeostasis be severe enough, it can induce a dysbiotic state, which plays a major role in the pathogenesis and progression of several extra-intestinal diseases, through bacterial components and metabolites and/or the host's immune system.

This document addresses a general approach of the gut microbiota and the relationship between the existing types of dysbiosis and extra-intestinal diseases, such as nephrolithiasis, non-alcoholic fatty liver disease and asthma, as well as actual therapies and future challenges.

**Keywords**

Gut Microbiota, Dysbiosis, Extra-Intestinal Diseases, Nephrolithiasis, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, Asthma.

## Lista de Abreviaturas

- ATP – Adenosina Tri-Fosfato
- IFN – Interferão
- Ig – Imunoglobulina
- IL – Interleucina
- LPS – Lipopolissacarídeo
- MHC II – Complexo Major de Histocompatibilidade Classe II (do inglês: *Major Histocompatibility Complex Class II*)
- RNA – Ácido Ribonucleico (do inglês: *Ribonucleic Acid*)
- T<sub>H</sub> – Linfócito T Auxiliar
- TNF – Fator de Necrose Tumoral (do inglês: *Tumor Necrosis Factor*)
- T<sub>Reg</sub> – Linfócito T Regulador
- UFC – Unidades Formadoras de Colônias
- VLDL – Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (do inglês: *Very Low-Density Lipoprotein*)

## **I – Introdução**

A ubiquidade da vida microbiológica é inegável. A partir do nascimento, o ser humano é exposto e colonizado por um elevado número de microrganismos, sejam oriundos da mãe ou do ambiente envolvente. Dos vários locais expostos destaca-se o trato gastrointestinal, que representa uma das maiores interfaces entre o organismo, antigénios e o ambiente envolvente. Este local é colonizado por aproximadamente  $10^{14}$  bactérias, com um peso total estimado de 1,13 quilogramas, que ultrapassa em cerca de dez vezes o número total de células presentes no organismo humano.<sup>10;11</sup> A este conjunto designou-se de microbiota intestinal e, ao longo dos tempos, tem vindo a evoluir com o hospedeiro com o objetivo de desenvolver uma relação mutuamente benéfica. A microbiota intestinal oferece um leque de benefícios ao ser humano, como o fortalecimento e a manutenção da integridade epitelial intestinal, a proteção contra agentes patogénicos e a regulação do sistema imunitário.<sup>10</sup>

Contudo, um desequilíbrio na microbiota, designado por disbiose, pode interferir na saúde do hospedeiro, tornando-se um contributo para o desenvolvimento de várias doenças intra e extra-intestinais.<sup>10</sup> No presente documento será abordada a relação entre a microbiota intestinal e potencial disbiose com algumas doenças extra-intestinais, assim como atuais terapias e desafios futuros.

## **2 – Composição, Biogeografia e Desenvolvimento da Microbiota Intestinal**

Até há alguns anos atrás, a grande maioria do conhecimento sobre a microbiota intestinal humana era derivada de métodos de cultura intensivos. Recentemente, esse paradigma foi alterado devido ao aparecimento de novas técnicas de sequenciação, independentes de culturas, com elevado rendimento e baixo custo, entre as quais se destaca a sequenciação do gene que codifica o ácido ribonucleico (RNA) ribossomal 16S. Este gene encontra-se em todas as bactérias conhecidas, pelo que esta técnica tem sido muito utilizada na identificação de espécies bacterianas.<sup>10</sup>

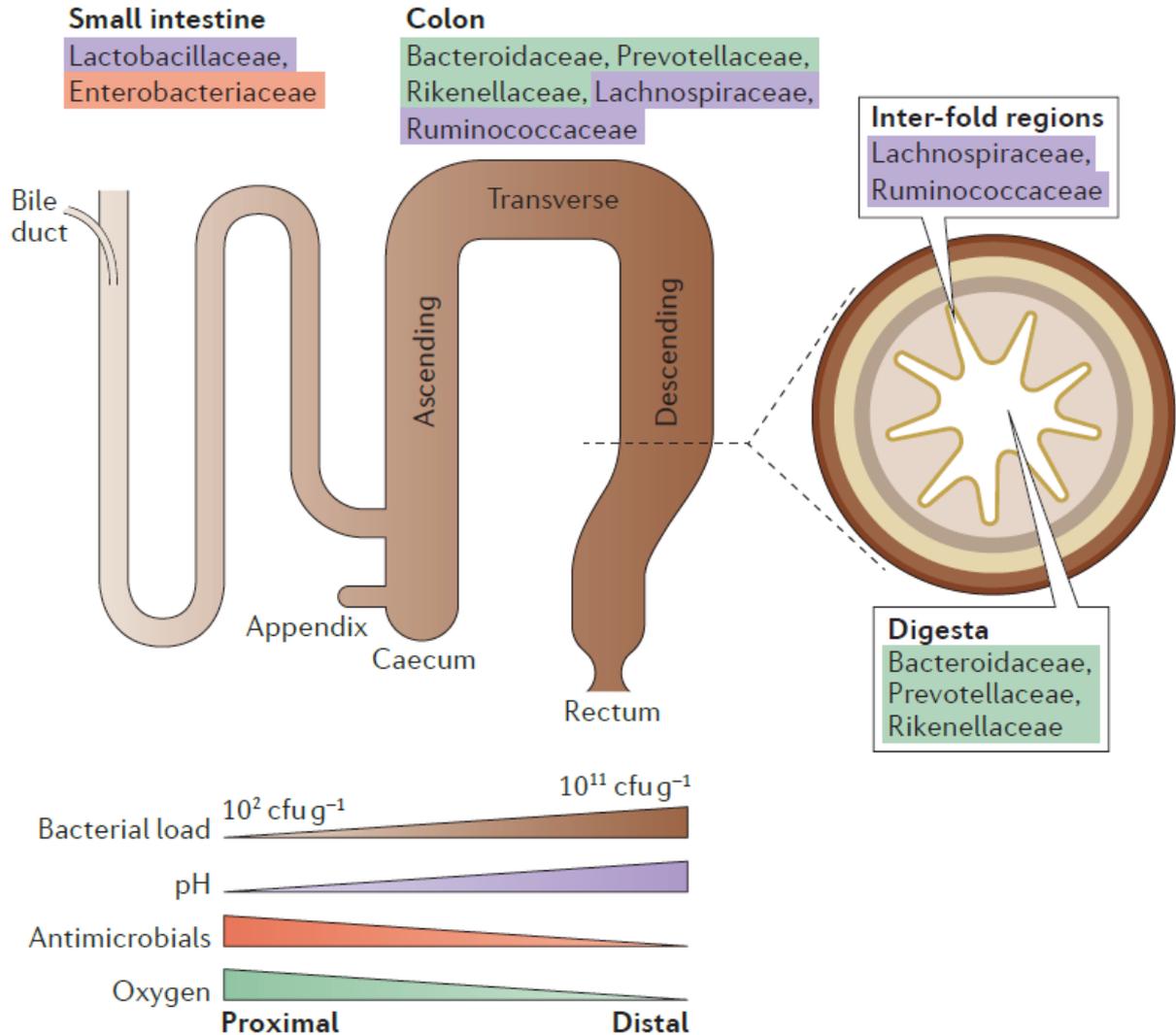
A microbiota intestinal adulta reúne entre centenas a milhares de espécies diferentes, onde os filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* se revelam dominantes. Este conjunto distingue-se de todos os outros ao incluir várias espécies que apenas se encontram nele, o que é um reflexo das propriedades do local onde se encontra, sendo estratificado tanto a nível longitudinal como a nível transversal. Ao comparar o intestino delgado com o cólon, é possível verificar várias diferenças fisiológicas, nomeadamente em termos dos níveis de pH, oxigénio e de

péptidos antimicrobianos, que vão influenciar a composição da microbiota quantitativamente e qualitativamente.<sup>10;12</sup>

Dominant gut phyla:

Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia

Predominant families in the:



**Figura I** – Composição e biogeografia da microbiota intestinal humana. **Cfug<sup>-1</sup>** – unidades formadoras de colónias por grama de amostra.<sup>12</sup>

Ao observar a Figura I, é visível que o intestino delgado é predominantemente colonizado por espécies das famílias *Lactobacillaceae* e *Enterobacteriaceae*. Dado que este local apresenta um valor de pH bastante baixo, um trânsito intestinal elevado e níveis altos de oxigénio e de antimicrobianos, já seria de esperar que este apenas fosse colonizado por bactérias aeróbias facultativas, de rápido crescimento, tolerantes aos compostos bactericidas e com uma boa capacidade de adesão ao epitélio ou muco intestinal, sendo a densidade bacteriana limitada. De salientar ainda que o intestino delgado é rico em ácidos biliares que,

devido às suas propriedades surfactantes, contribuem também para a composição da microbiota neste local, podendo interferir com a adesão das bactérias. Em contraste, as condições presentes no cólon permitem a sua colonização por uma comunidade mais densa e diversa, apresentando um número de unidades formadoras de colônias (UFC) na ordem dos  $10^{11}$  por grama de amostra e constituído por espécies de famílias mais diversas: *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*.<sup>12</sup>

Para além das diferenças a nível longitudinal, existe também heterogeneidade a nível transversal, uma vez que a zona do lúmen é habitada por famílias maioritariamente diferentes das que se apresentam nas criptas de Lieberkühn.<sup>10;12</sup> Esta última zona, assim como o apêndice, funciona também como um reservatório de diversidade bacteriana que, em caso de perturbação da homeostase da microbiota, oferece proteção a várias espécies, permitindo uma recolonização do lúmen mais facilitada.<sup>12</sup>

O desenvolvimento da microbiota acima descrita inicia-se logo durante o nascimento. Dependendo do modo como este é realizado, o recém-nascido entrará em contacto com bactérias diferentes, dado que passará por locais distintos se o parto for vaginal ou por cesariana. No caso de o parto ser vaginal, haverá uma maior colonização por espécies do género *Lactobacillus*, visto que este está presente em grande quantidade no trato vaginal. Caso seja por cesariana, o recém-nascido apresentará uma colonização inicial por anaeróbios facultativos como espécies de *Clostridium* e a colonização pelo género *Bacteroides* dar-se-á mais tardiamente. De notar ainda a importância da origem do leite a ser utilizado na alimentação do bebé no desenvolvimento da sua microbiota intestinal. O leite materno oferece várias vantagens sobre o leite artificial, como a transmissão de microrganismos, a proteção contra espécies patogénicas através de anticorpos maternos e a promoção do crescimento de certas espécies benéficas, como *Bifidobacterium longum* e alguns membros do género *Bacteroides*, capazes de utilizar os oligossacarídeos presentes no leite como fonte de carbono, em detrimento de outras.<sup>10;12</sup>

A microbiota intestinal jovem demora cerca de 2,5 a 3 anos a tornar-se adulta, tanto a nível de composição como a nível de diversidade e funcionalidade, mantendo-se relativamente estável durante a vida adulta do hospedeiro. Contudo, com o avançar da idade, a microbiota intestinal começa a perder diversidade e a sofrer um incremento em espécies anaeróbias facultativas, como *Escherichia coli*, acompanhado por um decréscimo em espécies produtoras de ácidos gordos de cadeia curta. Esta perda pode tornar-se relevante uma vez que estes compostos são importantes para o hospedeiro: por exemplo, o butirato auxilia na prevenção da translocação bacteriana através do fortalecimento da função barreira do epitélio intestinal, atuando sobre as *tight junctions* e aumentando a síntese de muco.<sup>10</sup>

### **3 – Fatores Influenciadores da Microbiota Intestinal**

Apesar de, como referido acima, a microbiota intestinal se manter relativamente estável na vida adulta do hospedeiro, esta revela uma grande variabilidade interindividual, ou seja, embora as famílias predominantes se mantenham ao longo da população, as espécies em concreto podem diferir de pessoa para pessoa. Tal observação deve-se ao facto da microbiota ser influenciada por vários fatores, tanto inerentes ao hospedeiro como externos, nomeadamente o tipo de dieta praticada, fármacos utilizados, o muco intestinal, o sistema imunitário e a genética do hospedeiro, levando a ligeiras alterações da mesma.<sup>10;13;14</sup>

#### **3.1 – Dieta**

A microbiota intestinal encontra-se sujeita aos nutrientes ingeridos pelo hospedeiro e à sua capacidade de os metabolizar para a sua sobrevivência. Assim, variações na dieta podem levar a diferenças a nível de composição e diversidade da microbiota.<sup>10;13;14</sup> Por exemplo, uma dieta rica em produtos de origem animal aumenta os níveis do género *Bacteroides* enquanto a ingestão de baixas quantidades de proteínas aliada a um incremento nos hidratos de carbono favorece o desenvolvimento do género *Prevotella*. Por outro lado, um consumo aumentado de gorduras provoca um decréscimo da diversidade e do filo *Bacteroidetes*, com aumento do filo *Firmicutes*. O elevado teor em gorduras pode também influenciar a microbiota indiretamente, através do conseqüente aumento de ácidos biliares, que promovem um ambiente de baixo pH e de atividade antimicrobiana.<sup>13</sup>

#### **3.2 – Fármacos**

Existem fármacos que exercem a sua influência na microbiota intestinal, principalmente as classes dos anti-inflamatórios não-esteróides e dos antibióticos. Os primeiros, como o ibuprofeno ou o naproxeno, afetam a composição da microbiota quando administrados de forma crónica, aumentando a abundância das famílias *Bacteroidaceae* e *Enterobacteriaceae*. Uma vez que esta classe terapêutica tem como efeito adverso úlceras gástricas, a toma concomitante de inibidores da bomba de prótons com o objetivo de proteger a mucosa deste efeito é comum e também pode influenciar a microbiota. Por sua vez, os antibióticos podem causar alterações na microbiota a curto ou a longo prazo, dependendo da molécula em questão. Compostos como a amoxicilina apenas surtem efeitos na microbiota durante o período de tratamento enquanto o uso de macrólidos em crianças leva a uma diminuição no filo *Firmicutes* e *Actinobacteria* duradoura. Do mesmo modo, o tratamento em adultos com

ciprofloxacina provoca um aumento na quantidade de aeróbios Gram-positivo, para além de uma diminuição da diversidade da microbiota temporária.<sup>13;14</sup>

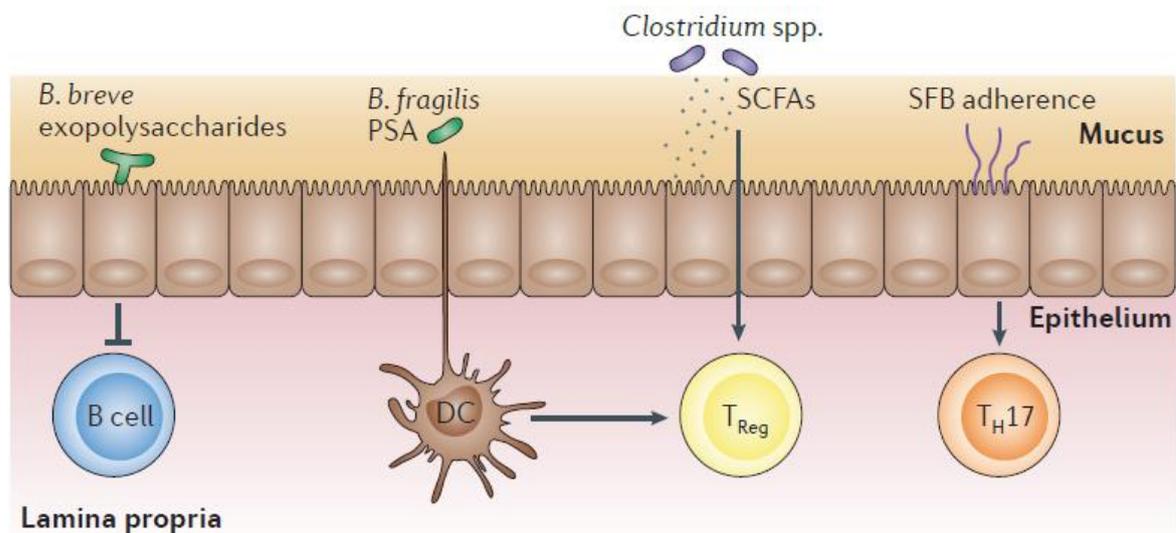
### 3.3 – Muco Intestinal

O epitélio intestinal humano encontra-se coberto de camadas de muco, secretado pelas células caliciformes, preenchendo parte do lúmen. Estas células produzem cerca de 200 mililitros de muco por dia, sendo esta quantidade regulada pela expressão do gene *MUC2*, que codifica a mucina *MUC2*, altamente glicosilada e principal componente das camadas do muco intestinal. A estrutura glicosídica presente na mucina assenta em O-glicanos contendo N-acetilglucosamina, galactose e N-acetilgalactosamina, constituindo 80% da massa molecular total da mucina. Para além de promover uma barreira física, o muco serve também de fonte nutricional e de local de adesão bacteriana. Espécies como *Akkermansia muciniphila*, *Ruminococcus intestinalis* e várias do género *Bifidobacterium*, são capazes de degradar os O-glicanos do muco de modo a obter e metabolizar os hidratos de carbono obtidos em seu proveito. Por outro lado, várias espécies, como por exemplo as pertencentes ao género *Lactobacillus*, expressam adesinas, fimbrias ou *pili* dotadas de domínios ligantes a hidratos de carbono, dependendo destas para uma colonização eficaz.<sup>10;12;13</sup>

### 3.4 – Sistema Imunitário

O sistema imunitário do hospedeiro tem uma das mais importantes relações com a microbiota intestinal, envolvendo tanto a imunidade humoral como a imunidade adaptativa. A imunidade inata regula a microbiota intestinal através da produção de péptidos antimicrobianos e interleucina (IL)-18, após reconhecimento de componentes e metabolitos bacterianos como lipoproteínas, flagelinas e peptidoglicanos por parte de recetores presentes no epitélio intestinal e nas células dendríticas, como recetores do tipo *toll*. Por outro lado, a imunidade celular influencia a microbiota através da produção de imunoglobulinas (Ig) A, mediada por linfócitos T foliculares auxiliares, e da ativação de células T *natural killer* por linfócitos CD1.<sup>15</sup>

Para além da regulação realizada pelo sistema imunitário, a microbiota intestinal também modula o sistema imunitário do hospedeiro, sendo um fator crucial no desenvolvimento e maturação do mesmo.<sup>12;15</sup>



**Figura 2** – Modulação do sistema imunitário pela microbiota intestinal, com alguns exemplos concretos. **DC** – Célula Dendrítica; **PSA** – Polissacarídeo A; **SCFA** – Ácidos Gordos de Cadeia Curta; **SFB** – Bactérias Segmentadas Filamentosas; **T<sub>Reg</sub>** – Linfócito T Regulador; **T<sub>H</sub>17** – Linfócito T Auxiliar 17.<sup>12</sup>

Ao analisar a Figura 2, observa-se que a microbiota exerce a sua influência sobre o sistema imunitário através de interações com o epitélio intestinal e de metabólitos bacterianos sinalizadores. Por exemplo, os exopolissacarídeos de *Bifidobacterium breve* provocam a redução da produção de citocinas inflamatórias, regulando as respostas imunes mediadas por linfócitos B. Por outro lado, o polissacarídeo A, constituinte da cápsula de *Bacteroides fragilis*, e ácidos gordos de cadeia curta produzidos por várias espécies do género *Clostridium* estimulam a indução de linfócitos T reguladores (T<sub>Reg</sub>) que, através da produção da citocina anti-inflamatória IL-10, contribuem ativamente para a manutenção da tolerância imunológica, regulando as respostas mediadas por células efetoras, nomeadamente em processos alérgicos e auto-imunes. De salientar ainda que bactérias segmentadas filamentosas promovem, através da adesão dos filamentos às microvilosidades intestinais, o desenvolvimento de linfócitos T auxiliares (T<sub>H</sub>) 17, importantes para a imunidade da mucosa a agentes patogénicos extracelulares.<sup>12; 15</sup>

### 3.5 – Genética

Por último, o genoma do hospedeiro influencia também, de modo indireto, a microbiota intestinal, através de mutações pontuais que possam ocorrer. Uma alteração no gene *MUC2*, referido anteriormente, pode levar à síntese de um muco ligeiramente diferente de pessoa para pessoa, afetando as espécies residentes. Do mesmo modo, a descendência de mães com alterações no gene codificante para a fucosiltransferase 2, uma enzima necessária para a

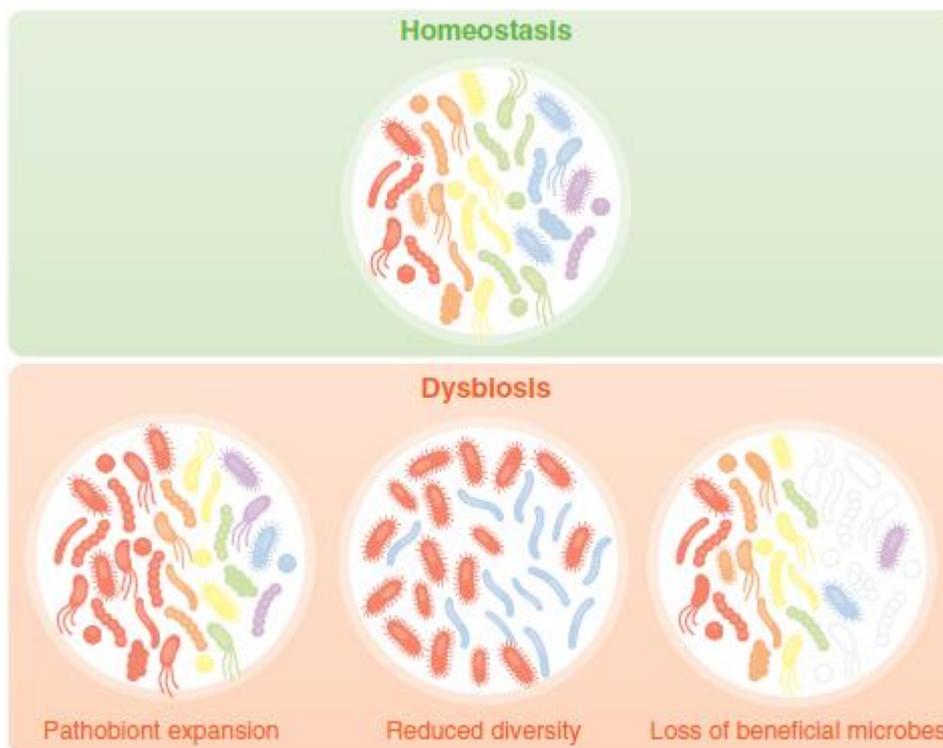
fucosilação (adição de moléculas de fucose) aos oligossacarídeos do leite, apresenta uma abundância diminuída dos géneros *Bacteroides* e *Bifidobacterium*.<sup>12</sup>

#### **4 – Da Normalidade à Disbiose**

Como visto anteriormente, vários fatores promovem ligeiras alterações à microbiota intestinal humana. Estas modificações podem ser amplificadas através do efeito de *stress* oxidativo e/ou da ação de bacteriófagos e bacteriocinas. Num estado inflamatório provocado por fármacos, alterações na dieta ou no sistema imunitário do hospedeiro, o *stress* oxidativo promove uma perda drástica de diversidade da microbiota, nomeadamente devido à intoxicação por oxigénio de espécies anaeróbias obrigatórias. Para além da redução da diversidade, as espécies reativas de oxigénio podem promover o crescimento de espécies potencialmente patogénicas, como *E. coli*, através da oxidação de compostos que serão utilizados no processo respiratório bacteriano. Por outro lado, pode haver ativação dos fagos presentes no intestino, provocando a lise bacteriana e uma consequente eliminação de várias espécies. Os componentes celulares libertados pela lise são reconhecidos pelo sistema imunitário do hospedeiro, ativando-se e contribuindo para a atividade lítica dos fagos, estabelecendo-se um ciclo hostil para a microbiota. Por último, em condições de *stress* há um aumento da produção de bacteriocinas, proteínas tóxicas tendo como alvo outras bactérias na disputa pelos nutrientes disponíveis no meio, exacerbando alterações na composição da microbiota intestinal.<sup>13</sup>

Todos estes fatores e variáveis conjugados podem levar a microbiota a um estado de disbiose, caracterizado por alterações notórias da comunidade comensal relativamente à microbiota de indivíduos saudáveis, sendo potencialmente nefastas para o organismo do hospedeiro. Podemos considerar três tipos de disbiose: expansão de patobiontes, perda de diversidade e perda de comensais. (Figura 3) Existem membros da microbiota normal pertencentes, por exemplo, à família *Enterobacteriaceae*, que apresentam potencial patogénico, sendo definidos como patobiontes. Estas bactérias, tipicamente em baixo número, podem proliferar em caso de alterações no ambiente intestinal e exercer os seus efeitos nocivos. Tais alterações podem também provocar perda de diversidade bacteriana e à perda de espécies benéficas ao hospedeiro. Os tipos de disbiose estão intimamente interligados, ocorrendo normalmente mais que um tipo em simultâneo. Uma perda de comensais pode ser acompanhada de uma perda de diversidade ou uma expansão de

patobiontes poderá estar ligada a uma perda de comensais através da alteração do ambiente envolvente.<sup>14;15</sup>



**Figura 3** – Comparação da microbiota saudável com os diferentes tipos de disbiose.<sup>14</sup>

Todos os tipos de disbiose levam a alterações tanto a nível da composição como a nível funcional, podendo contribuir para o desenvolvimento de doenças metabólicas, inflamatórias e auto-imunes.<sup>14;15;16;17</sup> De seguida, serão apresentados exemplos de doenças em que cada tipo de disbiose é mais relevante.

## **5 – Nefrolitíase**

A nefrolitíase é uma doença progressiva referente a uma acumulação de cristais de, principalmente, oxalato de cálcio (75% dos casos), nos rins ou noutros locais do trato urinário (urolitíase). A contínua deposição destes cristais leva à formação de cálculos que se assemelham a pequenas pedras, podendo causar grande desconforto, obstrução das vias urinárias e danos nos locais onde se encontram, sendo possível desencadear, por exemplo, insuficiência renal crónica.<sup>18</sup>

Normalmente, a nefrolitíase é associada a um quadro de hiperoxalúria, hipercalcúria e hipocitratúria, sendo a concentração do anião oxalato o fator decisivo na formação dos

cálculos.<sup>19</sup> O oxalato é um produto final do metabolismo, nomeadamente produzido pelo fígado, desprovido de qualquer funcionalidade para o organismo. Contudo, a dieta revela-se um fator importante na sua concentração, podendo contribuir até 50% para os níveis de oxalato na urina.<sup>20</sup> A excreção normal deste ião através da urina ronda os 0,25 milimol/24h, enquanto um indivíduo com hiperoxalúria apresenta níveis de excreção urinária superiores a 0,45 milimol/24h, resultando num risco acrescido de supersaturação do mesmo e, acompanhado de hiper calciúria, conseqüente cristalização de oxalato de cálcio. Estes dois fenómenos constituem a base da maioria dos mecanismos propostos da formação de cálculos renais. De salientar ainda que o ião citrato funciona como agente quelante do cálcio, e a sua reduzida concentração nestes doentes contribui também para a génese desta patologia.<sup>21</sup>

Recentemente, verificou-se que os níveis de oxalato podem ser regulados por determinadas bactérias com atividade decompositora do mesmo. Presentes na microbiota intestinal normal, as mais conhecidas podem ser organizadas em dois grupos:

- Oxalotróficos específicos, como o caso de *Oxalobacter formigenes*, que utilizam o oxalato como única fonte de carbono;
- Oxalotróficos não-específicos, como algumas espécies de *Bifidobacterium* e de *Lactobacillus* que, para além do oxalato, também podem utilizar outras fontes de carbono.<sup>20</sup>

Em indivíduos saudáveis, *O. formigenes* apresenta entre  $10^7$  a  $10^8$  UFC por grama de amostra fecal e possui capacidade de degradar mais que 1 grama de oxalato por dia<sup>18;19</sup>, sendo a decompositora de oxalato por excelência. Esta espécie, constituída por bacilos Gram-negativo e anaeróbia obrigatória, apresenta uma prevalência, em indivíduos saudáveis, entre 38% e 77%. Num estudo realizado para averiguar o desenvolvimento da colonização deste microrganismo, constatou-se que este foi primeiramente observado apenas por volta do primeiro ano de idade da criança, sendo que por volta dos 3-4 anos, a colonização era geral, apresentando posteriormente um declínio entre os 8 e 12 anos de idade.<sup>18</sup>

Uma vez que o oxalato se revela essencial para esta bactéria, tanto como fonte exclusiva de carbono como para a síntese de Adenosina Tri-Fosfato (ATP), este é obtido de duas formas, regulando assim a oxalúria:

- Através do consumo do oxalato presente no lúmen intestinal, proveniente da dieta, diminuindo a quantidade do ião disponível para absorção e, deste modo, a sua excreção urinária;
- Através da indução da secreção entérica de oxalato por parte da bactéria e posterior consumo. Apesar do mecanismo da indução não estar completamente esclarecido, foi

reportada a interação bactéria-intestino, levando à secreção de oxalato da camada serosa para a camada mucosa, levando à redução da oxalémia e, conseqüentemente, da oxalúria.<sup>18</sup>

Assim, um aporte elevado de cálcio pode influenciar a abundância deste microrganismo no intestino, dado que o cálcio se liga ao oxalato, diminuindo a sua biodisponibilidade. Por outro lado, esta espécie bacteriana é também suscetível a diversos tipos de antibióticos como macrólidos, quinolonas, tetraciclina e metronidazol. Um estudo realizado em humanos comparou a sua prevalência entre indivíduos infetados com *Helicobacter pylori*, estando medicados com claritromicina e metronidazol, e indivíduos que não estavam a receber qualquer tratamento antibiótico, servindo de grupo controlo. Através de testes em amostras fecais, observou-se que 92% do grupo controlo que estava colonizado por *O. formigenes* no início do mesmo manteve a situação, quando avaliado no primeiro e sexto mês. Contudo, apenas 38% dos indivíduos submetidos aos antibióticos permaneceram colonizados por *O. formigenes* nos períodos referidos. De salientar ainda que apenas um dos participantes cuja colonização desapareceu com a toma dos antibióticos conseguiu recuperar ao fim de 6 meses. Assim, estes dados suportam a suscetibilidade de *O. formigenes* aos antibióticos, podendo os dois fatores referidos constituir um risco para a formação de cálculos renais, através da perda deste comensal.<sup>18</sup>

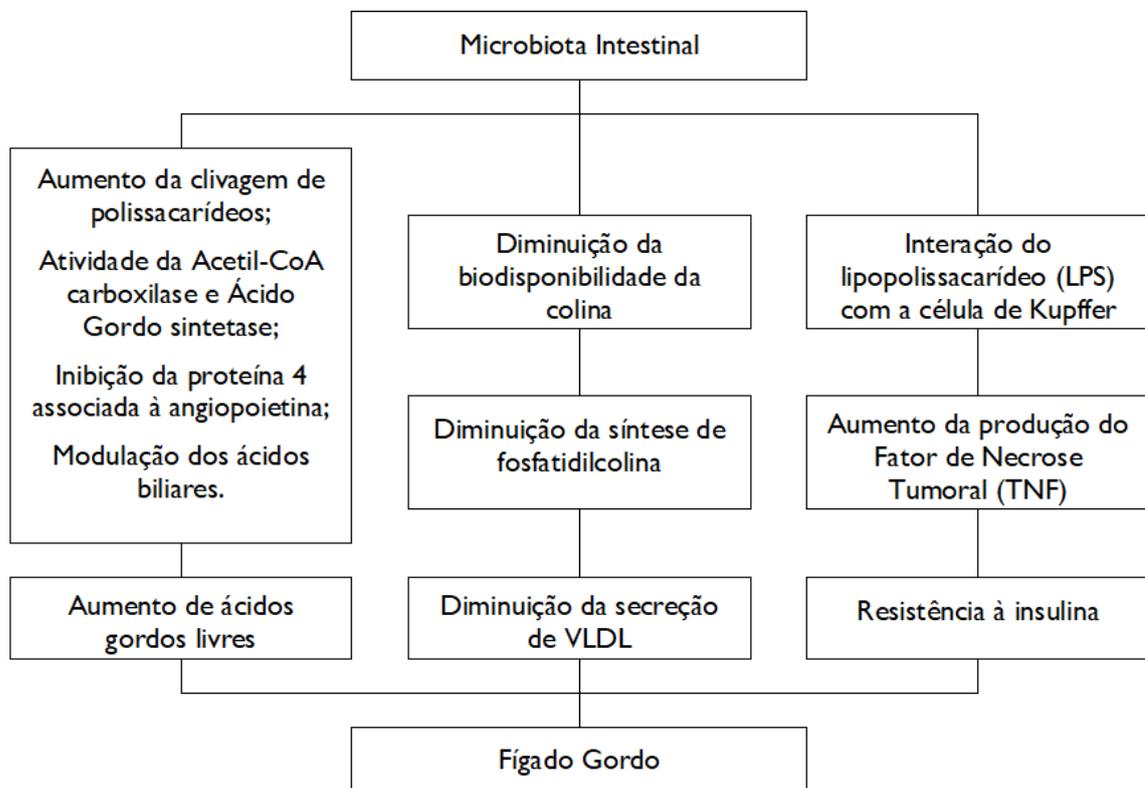
De facto, existem vários estudos epidemiológicos que apoiam um papel protetor deste microrganismo contra a nefrolitíase. Um estudo caso-controlo, tendo em conta a idade, sexo e região, envolveu 247 doentes com episódios recorrentes de cálculos renais e 259 indivíduos sem a patologia, demonstrando uma relação inversa bastante acentuada entre a colonização por *O. formigenes* e a recorrência de cálculos renais, reduzindo o seu risco em 70%. Entre o grupo controlo, foi observado um aumento na prevalência da bactéria com o aumento do consumo de oxalato, ocorrendo o inverso com a toma de antibióticos.<sup>18</sup>

Assim, torna-se possível relacionar uma eventual disbiose, com perda deste comensal, com o aparecimento e/ou desenvolvimento de nefrolitíase e urolitíase.

## **6 – Síndrome do Fígado Gordo Não-Alcoólico**

O Síndrome do Fígado Gordo Não-Alcoólico compreende um espectro de lesões desde esteatose (processo de retenção anormal de lípidos na célula) sem qualquer inflamação ou necrose envolvida até a um conjunto complexo de lesões hepáticas associadas a inflamação e apoptose, denominada como esteatohepatite não-alcoólica. Todo este espectro é considerado na ausência de consumo de álcool.<sup>22</sup> Considerado como o componente

hepático do síndrome metabólico<sup>23</sup>, esta condição pode estar associada a quadros de resistência à insulina, como obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2, sendo possível estar também relacionada com outras doenças como hepatite C, Doença de Wilson, entre outras. A esteatose é considerada patológica quando se observam gotas lipídicas em pelo menos 5% dos hepatócitos. Apesar da classificação binária esteatose simples/esteatohepatite não alcoólica ser bastante simplificada, é aceite que a presença de duas características, para além da esteatose, são necessárias e suficientes para o diagnóstico de esteatohepatite não alcoólica: inflamação lobular e hepatócitos em balão. A primeira envolve uma pequena concentração local de células inflamatórias, nomeadamente linfócitos e macrófagos, associada por vezes a necrose e apoptose hepática enquanto a segunda, como o nome indica, se refere à presença de hepatócitos com a forma de balão, arredondados e desprovidos de ângulos, com citoplasma transparente, floculado e sem vacúolos.<sup>22</sup>



**Figura 4** – Influência da microbiota intestinal na patogénese do Síndrome do Fígado Gordo Não Alcoólico. **CoA** – Co-Enzima A; **VLDL** – Lipoproteína de Muito Baixa Densidade.

O Síndrome do Fígado Gordo Não-Alcoólico é uma doença com múltiplos fatores associados, incluindo fatores genéticos, inflamatórios, metabólicos e ambientais. Contudo, é possível destacar três nos quais a microbiota intestinal pode influenciar: o aumento de ácidos gordos livres, a diminuição da secreção de Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (VLDL) pelo fígado e a resistência hepática à insulina.<sup>23</sup>

Observando a Figura 4, a microbiota intestinal pode aumentar a quantidade de ácidos gordos livres através do incremento de calorias obtidas provenientes da dieta, através da expressão de genes codificantes para enzimas que clivam polissacarídeos de diversas fontes. Por exemplo, *Bacteroides thetaiotamicron* é capaz de clivar a maioria das ligações glicosídicas presentes na dieta humana, conseguindo degradar polissacarídeos de plantas que o organismo por si só não consegue digerir, podendo fornecer até 15% das necessidades calóricas do hospedeiro. Além disso, a interação desta espécie bacteriana com outras pode aumentar a fermentação de frutanos (polímeros de frutose), dando origem a maiores quantidades de acetato.<sup>23</sup> Coerentemente, a administração de uma microbiota normal a ratinhos estéreis induziu um aumento acelerado da massa gorda e da produção de triglicéridos hepáticos, associados a atividade acrescida de duas enzimas consideradas fundamentais na síntese *de novo* de ácidos gordos: a Acetil-CoA carboxilase e a Ácido Gordo sintetase. De salientar ainda que a microbiota teve também um efeito inibitório sobre a proteína 4 associada à angiopoietina, inibidora da enzima lipoproteína lípase, crucial para a libertação dos ácidos gordos por parte dos quilomicrons.<sup>23,24</sup> Por último, a microbiota também modula o repertório de ácidos biliares presentes no lúmen intestinal. Estes compostos, para além de fundamentais na absorção de lípidos e vitaminas lipossolúveis, estão também envolvidos na manutenção da função de barreira intestinal e no metabolismo energético e lipídico. Desta forma, a microbiota pode influenciar estas vias que, por sua vez, podem levar a alterações como, por exemplo, modificações no armazenamento de ácidos gordos no fígado.<sup>23</sup>

A síntese de VLDL hepática é essencial à homeostase lipídica, promovendo o aporte dos mesmos às células do organismo. Esta síntese necessita, entre outros compostos, de fosfatidilcolina, derivada da colina, por sua vez obtida através da dieta. Assim, a quantidade de colina biodisponível pode ser afetada pela microbiota intestinal, cujas enzimas catalisam o primeiro passo na transformação da colina em dimetil e trimetilamina, sendo estes metabolitos posteriormente absorvidos e extensamente metabolizados através do efeito de primeira passagem hepática. Deste modo, alterações na microbiota podem levar a um aumento do metabolismo intestinal da colina e conseqüente diminuição da sua biodisponibilidade, afetando a síntese de VLDL e promovendo o desenvolvimento da

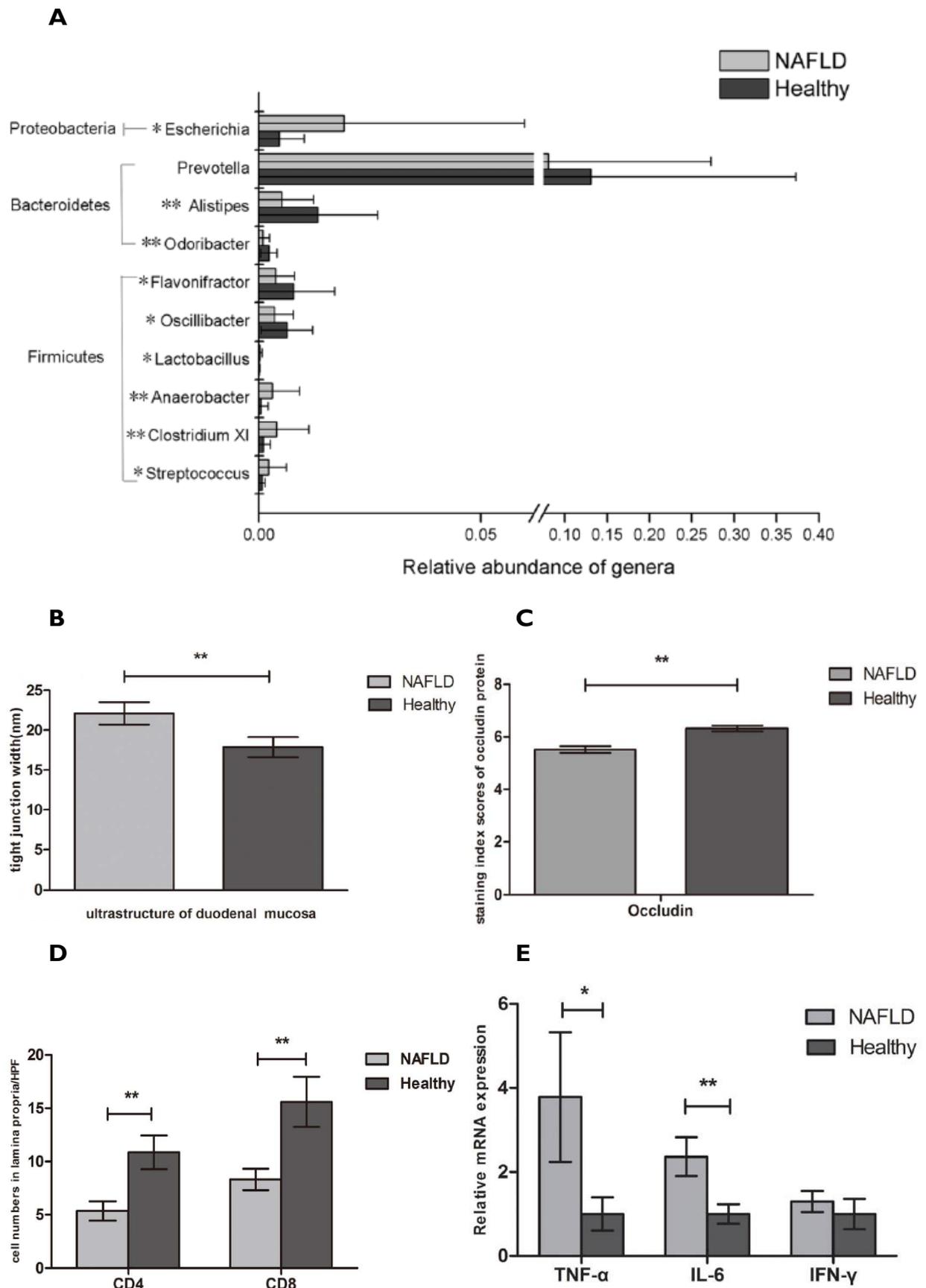
esteatose hepática.<sup>23</sup> Por exemplo, um estudo realizado em ratinhos concluiu que uma dieta rica em gorduras resulta numa estimulação enzimática da microbiota, levando a uma diminuição da colina absorvida e, por consequência, a um leque de sintomas que se assemelham a síndrome do fígado gordo não-alcoólico.<sup>23;25</sup>

Relativamente à resistência à insulina, a microbiota pode também desempenhar um papel preponderante, através de endotoxinas bacterianas, nomeadamente o lipopolissacarídeo (LPS). Presente nas bactérias Gram-negativo, este composto promove a resistência à insulina principalmente através de um mecanismo envolvendo a ligação do mesmo a um recetor *toll-like 4*, presentes nas células de Kupffer. Esta ligação desencadeia uma cascata de sinalização que provoca a ativação do fator nuclear  $\kappa$ B, através da degradação do seu inibidor, que por sua vez promove a transcrição de genes envolvidos em mecanismos inflamatórios, codificando, entre outras citocinas, o Fator de Necrose Tumoral (TNF), que pode induzir resistência à insulina em hepatócitos, adipócitos e células musculares esqueléticas, bloqueando a cascata sinalizadora promovida pelo recetor da mesma.<sup>23</sup>

Em suma, a microbiota intestinal desempenha um papel importante no desenvolvimento e progressão do síndrome do fígado gordo não-alcoólico. Várias evidências sugerem que um crescimento bacteriano aumentado a nível do intestino delgado estará relacionado com a progressão da doença. Este crescimento excessivo, possivelmente causado por disfunções da motilidade intestinal, associadas à diminuição dos níveis de suco gástrico, enzimas intestinais e ácidos biliares, foi associado a uma permeabilidade intestinal aumentada em indivíduos com este síndrome, com rutura das *tight junctions* entre as células epiteliares intestinais, com consequente translocação de endotoxinas bacterianas para a circulação sistémica.<sup>23</sup>

Contudo, apesar do que já foi referido, existem algumas questões que necessitam ser consideradas, tais como qual a composição da microbiota presente em doentes com o síndrome, se o estado inflamatório intestinal mediado pelo mesmo afeta o desenvolvimento da doença e se, de facto, a permeabilidade intestinal estará comprometida em doentes disbióticos.

Com o objetivo de encontrar respostas a essas questões, foi realizado um estudo em humanos, envolvendo 53 doentes com o síndrome e 32 indivíduos saudáveis, considerados como controlo, onde foi aplicada a sequenciação do gene que codifica o RNA ribossomal 16S em amostras fecais, obtendo o reportório bacteriano presente em cada indivíduo. Para além disso, foi realizada uma caracterização das *tight junctions* intestinais, dos linfócitos T CD4+ e CD8+ e de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e Interferão (IFN)- $\gamma$ ).<sup>26</sup>



**Figura 5** – Comparação da abundância de géneros presentes (A), da largura das *tight junctions* (B), da expressão da proteína ocludina (C), da quantidade de linfócitos T CD4+ e CD8+ (D) e da expressão relativa de RNA mensageiro codificante para citocinas inflamatórias (E) entre indivíduos doentes e indivíduos do grupo controlo. **NAFLD** – Síndrome do Fígado Gordo Não Alcoólico. \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$ <sup>26</sup>

Quanto à composição da microbiota, foram observadas diferenças a nível do filo *Lentisphaerae*, que se encontra diminuído nos indivíduos doentes. Relativamente ao género, houve um incremento significativo, no grupo teste, de *Clostridium XI*, pertencente à família *Peptostreptococcaceae*. Para além deste, houve aumento bastante acentuado do género *Streptococcus*, e do género do filo *Proteobacteria*, produtor de etanol, *Escherichia*, ambos considerados potencialmente patogénicos. Contrariamente, a família *Ruminococcaceae* revelou-se mais abundante no grupo controlo, estando dois géneros pertencentes à mesma, *Oscilibacter* e *Flavonifractor*, aumentados neste grupo. De salientar ainda que, dentro do filo *Bacteroidetes*, os géneros *Odoribacter* e *Alistipes* também se encontravam aumentados no grupo controlo, comparando com o grupo de teste.<sup>26</sup> (Figura 5A)

Após análise da microestrutura do duodeno dos dois grupos, constatou-se que estas eram bastante distintas. Enquanto no grupo controlo as *tight junctions* se encontrava intactas, com as microvilosidades bem alinhadas, o grupo teste apresenta disfunções nas *tight junctions*, com uma maior largura do que no grupo controlo, acompanhadas por organização irregular das microvilosidades duodenais. (Figura 5B) De modo a completar esta constatação, foi quantificada, por imunohistoquímica, a expressão da proteína ocludina, essencial para a formação das *tight junctions*, em ambos os grupos, tendo esta se revelado maior no grupo controlo.<sup>26</sup> (Figura 5C)

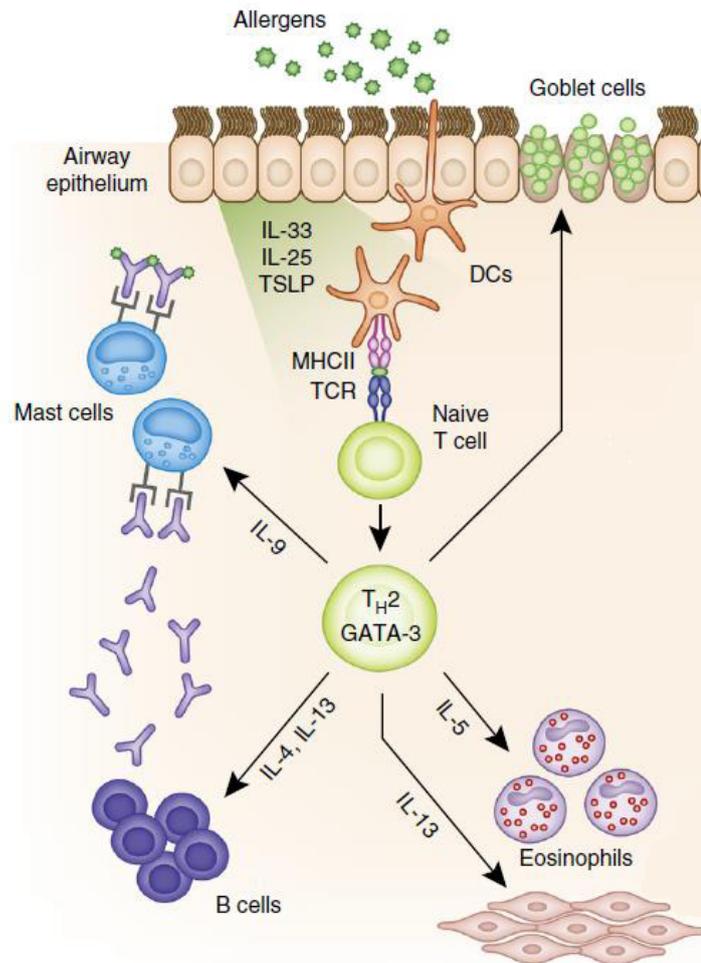
Uma vez realizada a caracterização dos linfócitos e das citocinas pró-inflamatórias, observou-se que, tanto os linfócitos T CD4+ como os CD8+ se apresentam quantitativamente diminuídos no grupo teste. (Figura 5D) Por outro lado, a expressão relativa do RNA mensageiro relativo ao TNF- $\alpha$  e a IL-6 foi significativamente mais elevada no grupo teste do que no grupo controlo. Quanto à expressão do IFN- $\gamma$ , apesar de tendencialmente maior no grupo teste, não teve significância estatística.<sup>26</sup> (Figura 5E)

Dados os resultados obtidos, existem vários aspetos passíveis de serem discutidos. Em primeiro lugar, foi possível concluir que a barreira intestinal se encontra bastante comprometida nos indivíduos doentes. Em segundo, os seus sistemas imunes locais apresentavam-se debilitados, uma vez que tanto os linfócitos T CD4+ como os CD8+ se encontravam em menor número, quando comparados com o grupo controlo. A perda de linfócitos T CD4+, dada a sua importância imunológica, pode levar a disfunção imune e perda de integridade epitelial, aumentando a probabilidade de translocação bacteriana, com consequente progressão da doença. Tal depleção pode ser devida à presença de LPS, associado, noutros estudos, à indução de apoptose em linfócitos *in vivo*. Como referido anteriormente, um dos géneros bastante aumentados em indivíduos doentes é o género *Escherichia*, bactérias Gram-negativo, que contribui para a presença de LPS no intestino. Por

outro lado, este género é também produtor de etanol, que é visto como um contributo para perturbações morfológicas e fisiológicas da barreira intestinal associada a um crescimento bacteriano aumentado. Para além deste efeito, o acetaldeído, um dos principais metabolitos do etanol, pode levar à produção de espécies reativas de oxigénio e a danos hepáticos por stress oxidativo.<sup>23; 26</sup> Deste modo, a abundância do género *Escherichia* é visto como um fator importante na progressão do síndrome do fígado gordo não alcoólico, tanto pela sua ação a nível intestinal como a nível hepático, através do LPS e do etanol. Para além deste género, também o género *Streptococcus* merece destaque. Espécies deste género, como *Streptococcus bovis* ou *Streptococcus faecalis* foram associadas à doença inflamatória intestinal, suportando o seu papel como bactérias pró-inflamatórias. Ao cruzar estas informações com os resultados obtidos quanto à expressão de citocinas pró-inflamatórias, é sugerido que a expansão excessiva de bactérias pró-inflamatórias estará associada a um nível elevado de citocinas pró-inflamatórias, acompanhado de um aumento da permeabilidade intestinal, que permite a translocação de componentes bacterianos até ao fígado, podendo esta ser responsável pelo desenvolvimento da doença. De salientar ainda a redução, no grupo teste, da família *Ruminococcaceae*, produtora de ácidos gordos de cadeia curta. Esta perda de espécies comensais leva a uma consequente diminuição dos metabolitos presentes e respetiva diminuição da ação anti-inflamatória.<sup>26</sup> Assim, seja por via metabólica ou por via inflamatória, uma disbiose associada a um crescimento aumentado de patobiontes pode ser um fator importante no desenvolvimento do síndrome do fígado gordo não-alcoólico.

## **7 – Asma**

A asma é uma doença inflamatória crónica das vias respiratórias, provocando hipersensibilidade das mesmas, maior produção de muco, hiperplasia epitelial e contração do músculo liso com consequente redução do fluxo de ar. Doença comum, afeta aproximadamente 300 milhões de pessoas em todo o mundo, que apresentam sintomas como tosse, pieira, dores no peito e falta de ar.<sup>27;28</sup> Trata-se de uma doença complexa, dividida em dois fenótipos: a asma alérgica (ou atópica) e a asma não-alérgica (ou intrínseca). A primeira encontra-se presente na maioria das crianças e em cerca de 50% dos adultos, relacionando-se com a sensibilização alérgica e presença aumentada de IgE, e a segunda, mais comum em mulheres, desenvolve-se mais tardiamente, não envolvendo qualquer mecanismo adaptativo.<sup>28</sup> No presente documento apenas será aprofundado o primeiro tipo dado que é este que se relaciona com a microbiota intestinal.



**Figura 6** – Patogênese da asma alérgica (ou atópica). **DC** – Célula Dendrítica; **GATA-3** – Fator de Transcrição GATA-3; **IL** – Interleucina; **MHCII** – Complexo Major de Histocompatibilidade Classe II; **TCR** – Recetor de Células T.<sup>28</sup>

Analisando a Figura 6, a patogênese da asma alérgica envolve a indução aumentada de linfócitos  $T_H2$ . O mecanismo inicia-se com a apresentação do alergénio pelas células dendríticas a linfócitos T *naive*, através do recetor de células T e com o auxílio do complexo major de histocompatibilidade classe II (MHC II), levando à diferenciação destas em linfócitos  $T_H2$ . Este subtipo celular produz seguidamente, com auxílio do fator de transcrição GATA-3, um conjunto de citocinas pro-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13) que contribuem para o desenvolvimento e manutenção do estado alérgico. As IL-4 e IL-13 provocam uma mudança de isótipos nos linfócitos B e metaplasia das células caliciformes, induzindo respetivamente a produção de IgE e de um muco mais espesso, e hiper-reatividade brônquica enquanto a IL-5 e a IL-9 induzem eosinofilia e recrutamento de mastócitos, respetivamente.<sup>27;28;29;30</sup> As IgE formadas contra o alergénio ligam-se aos mastócitos através de recetores presentes nos

mesmos e, quando ocorre ligação antigénio-anticorpo, há desgranulação destas células, em que os produtos derivados da desgranulação, como a histamina, contribuem para vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e, nas vias aéreas, aumento de produção de muco pelas células caliciformes e broncoconstrição, através da contração do músculo liso envolvente.<sup>30</sup>

Pensa-se que este fenótipo da doença ocorre maioritariamente nas crianças devido a um desequilíbrio do nível dos linfócitos  $T_H2$  em relação ao nível de linfócitos  $T_H1$ , devido à imaturidade do sistema imunitário, provocando um aumento da resposta imune mediada pelas primeiras. A microbiota intestinal pode desempenhar um papel fulcral na regulação deste mecanismo. Como visto anteriormente, a microbiota induz a diferenciação de linfócitos  $T_{Reg}$ , essenciais para a manutenção da tolerância imunológica e regulação das respostas imunes mediadas pelas células efectoras envolvidas em processos alérgicos e auto-imunes. Por outro lado, a microbiota promove a indução de linfócitos  $T_H1$ , que contrabalança a resposta imune mediada pelos linfócitos  $T_H2$ . Deste modo, estes processos mediados pela microbiota inibem as células efectoras no processo alérgico.<sup>29,31</sup>

Contudo, para que tal regulação ocorra, é necessário que a microbiota intestinal seja diversificada, de modo a “educar” o sistema imunitário do hospedeiro da melhor forma. Perante uma perda de diversidade, existe uma consequente disrupção dos mecanismos reguladores acima referidos e exacerbação das respostas imunes.

Dada a melhoria das condições de vida e de higiene e a banalização do uso de antibióticos surge, em 1989, a teoria da higiene, sugerindo que a falta de exposição a uma maior diversidade de microrganismos devido a um ambiente mais limpo nas sociedades desenvolvidas leva a um deficiente desenvolvimento do sistema imunitário, aumentando o risco de alergias. Em 1998, esta hipótese foi atualizada, tendo sido adaptada à microbiota, que propõe que as alterações na microbiota intestinal na infância provocadas pelo estilo de vida moderno afetam o desenvolvimento da tolerância imunológica das mucosas, levando a respostas imunes distorcidas. De salientar ainda a influência que o tipo de parto tem na diversidade bacteriana presente no recém-nascido, como referido anteriormente.<sup>29,32</sup>

Com o objetivo de avaliar o impacto da diversidade da microbiota intestinal na produção de IgE, foi realizado um estudo em modelos animais: ratinhos controlo, colonizados com uma microbiota intestinal livre de agentes patogénicos específicos, e ratinhos estéreis, ambos geneticamente imunocompetentes. Em primeiro lugar, foi avaliado o poder inibitório da produção destes anticorpos pela microbiota intestinal, tendo-se verificado a presença de níveis aumentados deste anticorpo nos ratinhos estéreis, em comparação com o controlo, que apresenta níveis de IgE inferiores ao limite de deteção. Apesar dos níveis elevados nos

ratinhos estéreis, estes não refletem uma hiperimunoglobulinemia geral, dado que todos os outros tipos de anticorpos se apresentam em concentração reduzida. Tal não acontece nos ratinhos controlo, o que suporta a teoria de que a microbiota é necessária para a maturação do sistema imunitário do hospedeiro. Estes primeiros resultados indicam que, à partida, é necessário uma microbiota diversa para regular os níveis de IgE. Porém, poderia haver a possibilidade de um microrganismo indetetável presente nos ratinhos estéreis ou algum alérgeno presente na dieta ser a causa do aumento de IgE. De modo a colmatar tal facto, ambos os grupos de ratinhos foram colocados em local comum, onde os ratinhos controlo não apresentaram nenhum aumento de concentração dos anticorpos em estudo, em comparação com ratinhos controlo separados dos estéreis, indicando a ausência de qualquer agente indutor desconhecido, que pudesse ser transferido horizontalmente. Para além disso, houve ratinhos estéreis que foram sujeitos a uma dieta livre de antígenos e que ainda assim desenvolveram níveis elevados de IgE. Assim, todo o conjunto destas observações aponta para a desregulação do sistema imunitário na ausência da microbiota.<sup>33</sup>

De seguida, foram administrados, em alturas diferentes, anticorpos contra linfócitos T CD4<sup>+</sup> e neutralizantes da IL-4 para avaliar o papel destas na produção de IgE, neste caso, dado que várias experiências *in vitro* e *in vivo* demonstraram casos em que tanto a célula como a citocina em questão não são necessárias à produção do anticorpo. Após a administração dos primeiros, houve uma completa anulação da indução de IgE, o que indica que a produção desta imunoglobulina está dependente deste tipo de linfócitos. Com a administração dos anticorpos neutralizantes da IL-4, houve uma queda significativa na concentração de IgE mas não total, o que pode ser explicado pela compensação de outras citocinas, como a IL-13, ou por neutralização incompleta da IL-4. Assim, a indução de IgE é dependente tanto dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> como da IL-4, suportando o mecanismo acima referido.<sup>33</sup>

Dados os mecanismos reguladores induzidos pela microbiota acima referidos, seria de esperar que a exposição a uma microbiota diversa ou até mesmo a administração de linfócitos T<sub>Reg</sub> ou de IL-10 recombinante conseguiriam reduzir a concentração de IgE. Contudo, após realização destes testes, tanto em ratinhos como em cachorros, utilizando a microbiota livre de agentes patogénicos específicos, apenas a exposição à microbiota na altura do nascimento foi capaz de suprimir a indução deste tipo de anticorpo, o que sugere a existência de uma janela temporal onde seja possível esta inibição, através da “educação” do sistema imunitário do hospedeiro, suportando a teoria da higiene acima referida.<sup>33</sup>

Por último, com o objetivo de avaliar o impacto do nível de diversidade bacteriana na inibição da produção de IgE, foram usados quatro modelos de microbiota, de diversidade

crecente, para colonizar ratinhos inicialmente estéreis. O primeiro modelo usado consistiu apenas na estirpe HA107 da espécie *E. coli*, o segundo com duas espécies, *Parabacteroides distasonis* e *Lactobacillus murinus*, o terceiro contava com oito espécies diferentes e o último reunia aproximadamente quarenta espécies distintas. Realizada a experiência, apenas a colonização com o último modelo conseguiu inibir eficazmente a indução do anticorpo em estudo.<sup>33</sup>

Assim, o conjunto dos dados apresentados reafirma o papel fundamental da diversidade da microbiota na proteção contra a hiperimunoglobulinemia E, demonstrando que uma disbiose a nível da diversidade bacteriana pode promover o desenvolvimento de asma e de outras reações alérgicas.

## **8 – Terapias e Desafios Futuros**

Vista a inegável influência da microbiota intestinal na patogênese de várias doenças extraintestinais, aliada ao aumento da compreensão da gênese e consequências das disbioses, tem-se vindo a investigar formas de atuar sobre a microbiota de modo a prevenir ou a tratar a doença subjacente. Como tal existem, atualmente, três medidas de rebiose, ou reconstituição da microbiota: o transplante fecal microbiano, a administração de probióticos e de prebióticos. A primeira consiste em substituir completamente a microbiota do doente por uma de um dador saudável, sendo esta via a mais drástica. Quanto à segunda, os probióticos referem-se a microrganismos que beneficiam o hospedeiro ao qual são administrados, como por exemplo espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, tendo como objetivo a promoção da expansão de comensais. Os prebióticos partilham o objetivo dos anteriores, contudo são componentes da dieta que fomentam o crescimento e metabolismo de microrganismos benéficos ao hospedeiro, levando a uma reconstituição da microbiota através de alterações nutricionais.<sup>15</sup> Todavia, apesar de estas estratégias serem bastante promissoras, há ainda a necessidade de dados mais robustos quanto à sua eficácia, uma vez que é necessário atingir uma estabilidade crónica da microbiota obtida através de transplante fecal<sup>15;34</sup>; de investigar aprofundadamente as condições necessárias para uma administração de probióticos eficaz em cada caso, sendo que esta depende da variabilidade interindividual à ação probiótica<sup>15;35</sup>; e de desenvolver dietas específicas e personalizadas.<sup>15</sup>

De salientar ainda outros desafios a considerar no futuro, tendo em vista a melhor compreensão do papel da microbiota em várias doenças, sejam elas intra ou extra-intestinais. Tendo em conta a vasta composição da microbiota na ausência de doença, talvez a

comparação de indivíduos doentes com indivíduos saudáveis nos estudos realizados não seja suficiente, sendo mais rigorosa a análise de amostras retiradas de indivíduos presentes no mesmo ambiente envolvente e com hábitos alimentares semelhantes. De notar também o interesse de incluir as possíveis manifestações diferentes da doença em estudo, podendo estratificar os doentes em subtipos e avaliar a microbiota em cada um deles. Por outro lado, um melhor entendimento dos compostos derivados e/ou modificados pela microbiota e as suas ligações com a doença poderá levar a novos e mais eficazes métodos de tratamento, controlo e prevenção. Ao definir estas moléculas como alvo terapêutico, torna-se possível ultrapassar a barreira da imensa variabilidade interindividual da microbiota e da sua relação com a doença, sendo mais fácil atuar sobre a mesma.<sup>15</sup>

## **9 – Considerações Finais**

Em suma, a influência da microbiota intestinal na homeostase do organismo humano é inegável, havendo uma relação de simbiose entre as bactérias e o hospedeiro. A desregulação deste equilíbrio leva conseqüentemente ao desenvolvimento de várias doenças, em diversos locais do corpo e com diversos mecanismos de patogénese, realçando a importância da relação acima referida. Apesar de ser uma área relativamente recente e com dados concretos limitados, existe cada vez mais interesse no estudo tanto a nível microbiológico como a nível do seu papel na génese e/ou desenvolvimento de diversas doenças. Acredito que, com o tempo e dada a quantidade de novos dados que aparecem a cada dia que passa, a terapêutica direcionada à microbiota e compostos relacionados irá ser vista como revolucionária na forma como são abordadas diversas doenças prevalentes na nossa sociedade, contribuindo para a melhoria da saúde e da qualidade de vida das populações.

## **Bibliografia**

1. Decreto-Lei n° 95/2004 de 22 de Abril do Ministério da Saúde. [Em linha]. Diário da República: I Série-A, N° 95 Disponível em: <http://data.dre.pt/eli/dec-lei/95/2004/04/22/p/dre/pt/html>
2. Portaria n° 769/2004 de 1 de Julho dos Ministérios da Economia e da Saúde. [Em linha]. Diário da República: I Série-B, N° 153 Disponível em: <http://data.dre.pt/eli/port/769/2004/07/01/p/dre/pt/html>
3. ISDIN - **Nutraisdin AF Pomada reparadora** [Em linha] [Consult. 22 mai. 2017]. Disponível em: <http://www.isdin.com/pt-PT/produto/nutraisdin/af-pomada-reparadora>
4. ISDIN - **Nutraisdin Creme de fralda** [Em linha] [Consult. 22 mai. 2017]. Disponível em: <http://www.isdin.com/pt-PT/produto/nutraisdin/creme-de-fralda>
5. GLAXOSMITHKLINE CONSUMER HEALTHCARE - **Resumo das Características do Medicamento Flonaze 50 microgramas/dose suspensão para pulverização nasal** [Em linha] [Consult. 22 mai. 2017]. Disponível em: [http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=585021&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=585021&tipo_doc=rcm)
6. MEDA PHARMA - PRODUTOS FARMACÊUTICOS, S.A. - **Resumo das Características do Medicamento Allergodil, 0,5 mg/ml, colírio, solução** [Em linha] [Consult. 22 mai. 2017]. Disponível em: [http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=9556&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=9556&tipo_doc=rcm)
7. SANOFI-AVENTIS – PRODUTOS FARMACÊUTICOS, Lda - **Resumo das Características do Medicamento Telfast 120, 120 mg comprimido revestido por película** [Em linha] [Consult. 22 mai. 2017]. Disponível em: [http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=8350&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=8350&tipo_doc=rcm)
8. LABIALFARMA – LABORATÓRIO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS E NUTRACÊUTICOS, S. A. - **Labialfarma** [Em linha], atual. 2010. [Consult. 14 ago. 2017]. Disponível em: <http://www.labialfarma.pt/>
9. Decreto-Lei n.º 46/2012 de 24 de fevereiro do Ministério da Saúde. [Em linha]. Diário da República: I.ª série, N.º 40 Disponível em: [www.dre.pt](http://www.dre.pt)
10. THURSBY, Elizabeth; JUGE, Nathalie - Introduction to the human gut microbiota.

**Biochemical Journal.** ISSN 0264-6021. 474:11 (2017) 1823–1836. doi: 10.1042/BCJ20160510.

11. SHIVAJI, S. - We are not alone: a case for the human microbiome in extra intestinal diseases. **Gut Pathogens.** ISSN 1757-4749. 9:13 (2017). doi: 10.1186/s13099-017-0163-3.

12. DONALDSON, Gregory P.; LEE, S.Melanie; MAZMANIAN, Sarkis K. - Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nature Reviews Microbiology.** ISSN 1740-1526. 14:1 (2016) 20–32. doi: 10.1038/nrmicro3552.

13. WEISS, G.Adrienne; HENNET, Thierry - Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. **Cellular and Molecular Life Sciences.** ISSN 1420-9071. 74:16 (2017) 2959–2977. doi: 10.1007/s00018-017-2509-x.

14. PETERSEN, Charisse; ROUND, June L. - Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. **Cellular Microbiology.** ISSN 1462-5814. 16:7 (2014) 1024–1033. doi: 10.1111/cmi.12308.

15. LEVY, Maayan *et al.* - Dysbiosis and the immune system. **Nature Reviews Immunology.** ISSN 1474-1733. 17:4 (2017) 219–232. doi: 10.1038/nri.2017.7.

16. JONSSON, Annika Lindskog; BÄCKHED, Fredrik - Role of gut microbiota in atherosclerosis. **Nature Reviews Cardiology.** ISSN 1759-5002. 14:2 (2016) 79–87. doi: 10.1038/nrcardio.2016.183.

17. CICCIA, Francesco *et al.* - The role of the gastrointestinal tract in the pathogenesis of rheumatic diseases. **Best Practice and Research Clinical Rheumatology.** ISSN 1521-6942. 30:5 (2016) 889–900. doi: 10.1016/j.berh.2016.10.003.

18. MEHTA, Mansi; GOLDFARB, David S.; NAZZAL, Lama - The role of the microbiome in kidney stone formation. **International Journal of Surgery.** ISSN 1743-9191. 36 (2016) 607–612. doi: 10.1016/j.ijssu.2016.11.024.

19. PECK, Ammon B.; CANALES, Benjamin K.; NGUYEN, Cuong Q. - Oxalate-degrading microorganisms or oxalate-degrading enzymes: which is the future therapy for enzymatic dissolution of calcium-oxalate uroliths in recurrent stone disease? **Urolithiasis.** ISSN 2194-7236. 44:1 (2016) 45–50. doi: 10.1007/s00240-015-0845-6.

20. HATCH, Marguerite - Gut microbiota and oxalate homeostasis. **Annals of Translational Medicine.** ISSN 2305-5847. 5:2 (2017) 36. doi: 10.21037/atm.2016.12.70.

21. RODGERS, Allen L. - Physicochemical mechanisms of stone formation. **Urolithiasis**. ISSN 2194-7236. 45:1 (2017) 27–32. doi: 10.1007/s00240-016-0942-1.
22. BEDOSSA, Pierre - Pathology of non- alcoholic fatty liver disease. **Liver International**. ISSN 1478-3223. 37:Supple. 1 (2017) 85–89. doi: 10.1111/liv.13301.
23. QUIGLEY, Ahmed Abu-Shanab And Eamonn M. M. - The role of the gut microbiota in nonalcoholic fatty liver disease. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**. ISSN 1759-5045. 7 (2010) 691–701. doi: 10.1038/nrgastro.2010.172.
24. DING, Hao *et al.* - The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. ISSN 0027-8424. 101:44 (2004) 15718–15723. doi: 10.1073/pnas.0407076101.
25. DUMAS, Marc-emmanuel *et al.* - Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. ISSN 0027-8424. 103:33 (2006) 12511–12516. doi: 10.1073/pnas.0601056103.
26. JIANG, Weiwei *et al.* - Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease. **Scientific Reports**. ISSN 2045-2322. 5 (2015) 8096. doi: 10.1038/srep08096.
27. RUSSELL, Richard J.; BRIGHTLING, Christopher - Pathogenesis of asthma: implications for precision medicine. **Clinical Science**. ISSN 0143-5221. 131:14 (2017) 1723–1735. doi: 10.1042/CS20160253.
28. LAMBRECHT, Bart N.; HAMMAD, Hamida - The immunology of asthma. **Nature immunology**. ISSN 1529-2908. 16:1 (2015) 45–56. doi: 10.1038/ni.3049.
29. MCLOUGHLIN, Rachel M.; MILLS, Kingston H. G. - Influence of gastrointestinal commensal bacteria on the immune responses that mediate allergy and asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. ISSN 0091-6749. 127:5 (2011) 1097–1107. doi: 10.1016/j.jaci.2011.02.012.
30. GALLI, Stephen J.; TSAI, Mindy - IgE and mast cells in allergic disease. **Nature Medicine**. ISSN 1078-8956. 18:5 (2012) 693–704. doi: 10.1038/nm.2755.
31. RIISER, Amund - The human microbiome , asthma , and allergy. **Allergy, Asthma and Clinical Immunology**. ISSN 1710-1492.11 (2015) 35. doi:10.1186/s13223-015-0102-0.

32. OKADA, H. *et al.* - The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. **Clinical and Experimental Immunology**. ISSN 0009-9104. 160:1 (2010) 1–9. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04139.x.
33. WYSS, Madeleine *et al.* - Intestinal Microbial Diversity during Early-Life Colonization Shapes Long-Term IgE Levels. **Cell Host and Microbe**. ISSN 1931-3128. 14:5 (2013) 559–570. doi: 10.1016/j.chom.2013.10.004.
34. ANGELBERGER, Sieglinde *et al.* - Temporal Bacterial Community Dynamics Vary Among Ulcerative Colitis Patients After Fecal Microbiota Transplantation. **The American journal of gastroenterology**. ISSN 0002-9270. 108:10 (2013) 1620–1630. doi: 10.1038/ajg.2013.257.
35. MALDONADO-GÓMEZ, María X. *et al.* - Stable Engraftment of *Bifidobacterium longum* AH1206 in the Human Gut Depends on Individualized Features of the Resident Microbiome. **Cell Host and Microbe**. ISSN 1931-3128. 20:4 (2016) 515–526. doi: 10.1016/j.chom.2016.09.001.