



Daniela Sofia Soares de Almeida

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “ A Proteína CD47 no Cancro, Doenças Cardiovasculares e Importância do seu Bloqueio na Aterosclerose” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, da Dra. Maria do Carmo Moço, da Dra. Maria José Marramaque e do Professor Doutor José Barata Custódio e 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

Daniela Sofia Soares de Almeida

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “ A Proteína CD47 no Cancro, Doenças Cardiovasculares e Importância do seu Bloqueio na Aterosclerose” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, da Dra. Maria do Carmo Moço, da Dra. Maria José Marramaque e do Professor Doutor José Barata Custódio e 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, Daniela Sofia Soares de Almeida, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2012143167, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “A proteína CD47 no cancro, doenças cardiovasculares e importância do seu bloqueio na aterosclerose” 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, 11 de setembro de 2017.

Daniela Sofia Soares de Almeida

(Daniela Sofia Soares de Almeida)

AGRADECIMENTOS

Após a elaboração deste trabalho, não posso deixar de expressar os meus agradecimentos a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização do mesmo.

As minhas primeiras palavras de agradecimento dirigem-se ao meu orientador interno, Professor Doutor José Custódio, pelo seu forte contributo na concretização deste trabalho e por ter-se demonstrado sempre disponível para me ajudar e responder a todas as minhas dúvidas.

Agradeço também à Dra. Maria do Carmo Moço, pela excelente experiência que me proporcionou em farmácia comunitária, pelos conhecimentos transmitidos e pelo apoio constante.

A toda a equipa da Farmácia Moço tenho de agradecer não apenas pelo apoio incondicional e pela ajuda constante, mas especialmente pela simpatia e amizade que senti durante todo o tempo de estágio.

Devo ainda um sincero agradecimento à Dra. Maria José Marramaque, por ter demonstrado estar sempre disponível para esclarecer todas as minhas dúvidas e pelo esforço que fez em estar presente em todas as etapas do meu estágio na Empifarma.

Aos elementos da Empifarma, agradeço a forma como me integraram na empresa e a disponibilidade em me ajudar nas diversas tarefas do estágio.

Aos meus tios, prima e irmãos, a quem devo todo o meu percurso académico, agradeço o incentivo e apoio permanente e, principalmente, um imenso obrigado por esta oportunidade que me possibilitaram ter. A concretização deste sonho não teria sido possível sem eles.

À Filipa e Joana, agradeço a amizade constante, bem como o facto de terem percorrido todo este longo caminho a meu lado, tornando-o mais fácil.

Ao Bruno, agradeço o seu apoio incondicional e por acreditar sempre em mim. A ele devo um eterno obrigado.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| Abreviaturas | 5 |
| Introdução Geral | 6 |
| Capítulo I: Farmácia Moço | 8 |
| Introdução | 9 |
| Farmácia Moço | 10 |
| Estágio Curricular | 11 |
| Análise SWOT | 14 |
| Pontos Fortes..... | 14 |
| Pontos Fracos..... | 15 |
| Oportunidades | 16 |
| Ameaças..... | 17 |
| Intervenção Farmacêutica | 18 |
| Caso Prático 1 – Confusão com marca e genérico | 18 |
| Caso Prático 2 – Uso incorreto de antibióticos | 19 |
| Caso Prático 3 – Ter sempre em atenção a medicação habitual | 19 |
| Caso Prático 4 – Correta utilização de dispositivos de inalação..... | 20 |
| Caso Prático 5 – Importância de medidas não-farmacológicas..... | 21 |
| Conclusão | 22 |
| Bibliografia | 23 |
| Capítulo II: Empifarma | 24 |
| Introdução | 25 |
| Empifarma – Produtos Farmacêuticos, S.A. | 26 |
| Estágio Curricular | 27 |
| Análise Swot | 29 |
| Pontes Fortes | 29 |
| Pontos Fracos..... | 30 |
| Oportunidades | 30 |
| Ameaças..... | 31 |
| Conclusão | 32 |
| Bibliografia | 33 |
| Capítulo III: A proteína CD47 no cancro, doenças cardiovasculares e importância do seu bloqueio na aterosclerose | 34 |
| Resumo | 35 |
| Abstract | 36 |
| Introdução | 37 |
| CD47 | 39 |
| Estrutura e Função | 39 |

| | |
|--|-----------|
| Interação CD47/SIRP α | 40 |
| Interação CD47/trombospondina-I | 42 |
| CD47 e o Sistema Imunitário Inato..... | 44 |
| CD47 e Cancro | 45 |
| CD47 e Doenças Cardiovasculares | 49 |
| CD47 e Aterosclerose..... | 52 |
| CD47 Como Alvo Terapêutico..... | 54 |
| Conclusão | 57 |
| Bibliografia | 58 |

ABREVIATURAS

CD47 – Grupo de diferenciação 47 (do Inglês *Cluster of Differentiation 47*)

CD47^{-/-} – Células não expressam CD47

GMPc – Monofosfato de guanosina cíclico

IgG – Imunoglobulina G

KDa – Quilodalton (do Inglês *Kilodalton*)

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

NADPH – Dinucleótido de nicotinamida e adenina (fosfato)

NH₂-terminal – Amino-terminal

NO – Óxido Nítrico

NP EN ISO 9001:2015 – Versão portuguesa da Norma Europeia EN ISO 9001:2015

RCM – Resumo das Características do Medicamento

Scr 2 – Proteína tirosina cinase oncogénica

SHP – Proteína tirosina fosfatase

SH2 – Proteína tirosina fosfatase que contém o domínio homólogo a Scr 2

siRNA – RNA inibitório

SIRP α – Sinal regulador da proteína alfa

SIRP β 1 – Sinal regulador da proteína beta-1

SIRP β 2 – Sinal regulador da proteína beta-2

SIRP γ – Sinal regulador da proteína gama

SIRP δ – Sinal regulador da proteína delta

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

TNF – Fator de necrose tumoral

INTRODUÇÃO GERAL

O presente documento *Relatório de Estágio e Monografia intitulada “A proteína CD47 no cancro, doenças cardiovasculares e importância do seu bloqueio na aterosclerose”* foi realizado no âmbito da unidade curricular de Estágio e visa o término do curso de Ciências Farmacêuticas, com obtenção do grau de Mestre.

Este documento é composto por três capítulos. No primeiro capítulo está descrita a experiência obtida ao longo de quatro meses de estágio na Farmácia Moço. Neste é referida a aprendizagem obtida nas diferentes valências que o trabalho em farmácia comunitária exige.

A Empifarma, um armazém de distribuição grossista de medicamentos, é o principal fornecedor da Farmácia Moço. É através deste armazém que a farmácia obtém a grande maioria dos produtos que dispensa ao público, garantindo a acessibilidade de todos os utentes aos medicamentos e outros produtos de que necessitam. No período em que estive na Farmácia Moço percebi o quanto é importante uma adequada gestão e logística por parte do fornecedor, tanto no armazenamento como no transporte dos produtos. Assim, é necessária uma elevada organização para que as encomendas cheguem nas quantidades corretas, os produtos sejam os solicitados e estejam nas condições adequadas. Só desta forma é possível a sua correta dispensa ao utente. Deste modo, considero que o setor de distribuição por grosso de medicamentos é de extrema relevância, pelo que no capítulo II deste documento estão contempladas as atividades da Empifarma, dando relevância aos aspetos necessários para o correto fornecimento de medicamentos.

Em farmácia comunitária uma das primeiras tarefas que realizei foi a medição da tensão arterial e avaliação de parâmetros bioquímicos que constituem uma das grandes preocupações de inúmeros utentes com patologias como a hipertensão arterial e a hipercolesterolemia. Considerando estes aspetos, pretendi melhorar os meus conhecimentos, através da realização da monografia acima referida, de modo a complementar a minha formação no aconselhamento aos utentes. Sabendo que aquelas duas patologias constituem fatores de risco para doenças cardiovasculares, optei por realizar diferentes pesquisas sobre este tema. Durante a pesquisa que efetuei surgiu o nome de uma proteína, que estava a ser investigada no tratamento de doenças cardiovasculares, a proteína CD47. Após uma pesquisa mais aprofundada sobre esta proteína apercebi-me que esta tem um papel essencial numa doença cardiovascular em particular, a aterosclerose, e que existe

ainda um enorme foco da sua importância no tratamento de diversas neoplasias. Deste modo, considerei que teria enorme interesse realizar uma revisão bibliográfica que se centrasse na ação de CD47 no tratamento destas diferentes patologias, constituindo este assunto o tema do capítulo III.

CAPÍTULO I: FARMÁCIA MOÇO

INTRODUÇÃO

A farmácia comunitária é um ramo das Ciências Farmacêuticas que tem uma enorme importância dada a sua proximidade com a população. O farmacêutico comunitário tem como foco principal o bem-estar do utente, desempenhando um papel crucial no aconselhamento e no acompanhamento farmacoterapêutico de cada utente.

O farmacêutico no desempenhar das suas funções deve adaptar o seu aconselhamento tendo em conta as necessidades próprias de cada utente. No decorrer do exercício da sua atividade, é importante advertir os utentes para o uso racional do medicamento, assim como informar os utentes acerca de interações medicamentosas possíveis de ocorrer, contraindicações e reações adversas que poderão ser esperadas consoante a medicação. É ainda relevante transmitir alguma informação acerca de possíveis terapêuticas não farmacológicas que possam ser implementadas para melhorar o bem-estar do utente. Assim, o farmacêutico supera o papel de especialista do medicamento, por desempenhar as suas funções não apenas como técnico do medicamento, mas sim, com a responsabilidade de melhoria da qualidade de vida dos utentes, salvaguardando a saúde pública.

A realização do estágio na farmácia Moço permitiu-me estabelecer o primeiro contacto prolongado com os utentes, tendo a possibilidade de aplicar na prática os conhecimentos obtidos no MICF e adquirir novos conhecimentos. Seguidamente, apresento as diversas valências que adquiri com a realização do estágio, desde a receção de encomendas à dispensa de medicamentos ao público, salientando a aprendizagem obtida quer a nível científico quer a nível pessoal. Pode verificar-se ainda a execução de uma análise SWOT, a qual permite avaliar criticamente a realização do estágio.

FARMÁCIA MOÇO

A farmácia Moço estava anteriormente localizada em Almalaguês, tendo sido transferida, em 2012, para as instalações atuais em Coimbra. Sob orientação da Dra. Maria do Carmo Moço, proprietária e diretora técnica, realizei o estágio curricular nesta farmácia.

A farmácia Moço está situada na Avenida Fernando Namora e assegura um horário de funcionamento contínuo, estando aberta de segunda a sexta-feira das 09h00 às 21h30 e aos sábados das 09h00 às 20h00. De 20 em 20 dias a farmácia fica em serviço permanente, ficando aberta 24 horas.

Esta farmácia tem dois pisos, sendo que no rés-do-chão encontra-se a área de atendimento ao público, dois gabinetes de atendimento personalizado, uma zona de armazenagem e o laboratório. Num dos gabinetes são realizadas determinações de parâmetros bioquímicos e administração de injetáveis, enquanto no outro é dedicado às consultas de podologia, de nutrição e às várias formações decorridas na farmácia. No piso -I pode encontrar-se a sala de convívio, o armazém secundário e ainda a área de receção de encomendas.

A área de atendimento é composta por cinco balcões devidamente individualizados, de forma a garantir a privacidade de cada utente. Nesta área pode verificar-se que a farmácia possui uma extensa zona dedicada à dermocosmética. Com diferentes gamas de produtos, consegue ter-se em conta qualquer que seja a necessidade manifestada pelos utentes. Pode encontrar-se ainda um espaço dedicado à disposição de uma vasta variedade de meias de compressão, o que realça a importância que é atribuída à prevenção de doenças vasculares que afetam grande parte da população.

Uma vez por semana desloca-se uma nutricionista à farmácia, onde ocorrem consultas de nutrição de forma a reeducar os utentes para a adoção de um estilo de vida mais saudável, melhorando os hábitos alimentares, tendo como objetivo o controlo de peso ou de patologias como a hipertensão, diabetes ou dislipidemia. Assim, os utentes da farmácia podem usufruir de uma forte componente de produtos dietéticos, para fazer face às suas necessidades.

A área de armazenamento que fica contígua ao local de atendimento é constituída por um armário com gavetas deslizantes onde, à exceção de medicamentos genéricos, são arrumados por ordem alfabética todos os medicamentos consoante a sua forma

farmacêutica. Os medicamentos genéricos, em forma de comprimidos ou cápsulas, são dispostos por ordem alfabética num armário próximo. Os produtos termolábeis localizam-se num frigorífico localizado também nessa zona. Ainda neste piso pode encontrar-se o laboratório, local onde ocorre a preparação dos medicamentos manipulados, sendo este devidamente equipado para o efeito.

Na farmácia pode encontrar-se ainda um armazém secundário localizado no piso -I, o qual contém o excesso de medicamentos existente nas gavetas deslizantes, medicamentos não sujeitos a receita médica, produtos de dermocosmética, dietética, entre outros. A área de receção de encomendas situa-se também neste piso, sendo o local onde se recebem e confirmam todas as encomendas dos diversos fornecedores.

ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio na farmácia Moço teve início com o desenvolvimento de tarefas administrativas, nomeadamente, a encomenda, a receção e o armazenamento de produtos. Estas atividades são cruciais para que todos os processos seguintes, em particular o atendimento ao público, decorram de forma eficaz.

As encomendas de produtos podem ser realizadas a armazéns grossistas, diretamente ao laboratório (através dos delegados de informação médica) ou a fornecedores de algum produto específico, como no caso das meias de compressão e produtos veterinários. As encomendas a armazéns grossistas são efetuadas diariamente. A Empifarma é o principal fornecedor da farmácia Moço, efetuando-se por vezes encomendas à Plural ou *Alliance Healthcare* quando se pretende adquirir produtos esgotados ou rateados, quando existe vantagem comercial na obtenção de um produto específico ou quando o horário de entrega é vantajoso. Estes armazéns grossistas apresentam diversas vantagens, tais como, a possibilidade de comprar uma pequena quantidade de produtos, rapidez na entrega dos produtos e uma maior facilidade em efetuar devoluções. A aquisição de produtos diretamente ao laboratório é, normalmente, favorável por apresentar melhores condições comerciais. No entanto, implica que seja efetuada uma encomenda com uma elevada quantidade de produtos.

O aprovisionamento de produtos é efetuado por um elemento da farmácia Moço que está responsável pelas encomendas diárias. Estas são criadas pelo sistema informático quando se atinge o *stock* mínimo de certos produtos, gerando uma proposta para a

encomenda. O responsável pelas encomendas avalia essa proposta e procede ao seu envio aos fornecedores. É ainda possível efetuar encomendas instantâneas durante os atendimentos, quando se deteta a falta de stock de algum produto. Todas as encomendas que chegam à farmácia estão acompanhadas por uma guia de remessa ou por uma fatura, na qual constam os produtos encomendados, as respetivas quantidades, o preço de venda à farmácia, o preço de venda ao público, quando aplicável, e possíveis bónus ou descontos.

Quando se procede à receção das encomendas deve-se ter em atenção se a encomenda corresponde ao que está descrito na guia de remessa ou na fatura. Para além disso, devem avaliar-se outros aspetos, particularmente, a validade de cada produto e a sua integridade. No caso de existirem produtos que requerem condições especiais de armazenamento (produtos que devem ser armazenados entre 2 a 8°C), estes devem ser imediatamente integrados no local de armazenamento adequado. Esta foi uma atividade bastante importante, pois foi o primeiro contacto com o sistema informático e com os inúmeros produtos existentes na farmácia.

Na receção de encomendas caso se detete que um produto tem um prazo de validade demasiado curto para ser vendido ao público ou que um produto foi danificado, deve proceder-se à sua devolução para o respetivo fornecedor. Durante o estágio realizei algumas devoluções e, posteriormente, a respetiva regularização com notas de crédito.

Após estas tarefas, seguiu-se o armazenamento das encomendas recebidas. Este processo é fundamental para aprender a localização de cada produto e facilitar o atendimento ao público. Neste processo deve ter-se em atenção a validade de cada produto, colocando sempre os produtos com prazo de validade mais curto na frente do stock existente, ou seja, seguindo o princípio do «primeiro a expirar, primeiro a sair».

Após esta fase de aprendizagem na área administrativa, comecei gradualmente a ter um contacto mais aprofundado com todos os passos requeridos para um atendimento ao público, através da realização de pedidos de domicílio. Assim, aprendi a trabalhar com o programa informático Sifarma 2000®, comecei a familiarizar-me com os nomes comerciais dos medicamentos e com as receitas médicas, quer fossem eletrónicas ou manuais. Este aspeto foi fundamental para a fase seguinte, o atendimento ao público.

O atendimento ao público foi um desafio muito importante deste estágio. Foi nesta fase que me surgiram mais dúvidas, tornando-se numa fonte de aprendizagem contínua. Tive contacto com distintas realidades socioculturais, o que foi um desafio dado ser necessária uma adaptação constante às diferentes pessoas que vão à farmácia. A diversidade das

situações que surgiram no atendimento ao público, permitiu-me adquirir um conhecimento muito abrangente em farmácia comunitária.

No decorrer do estágio ainda tive a oportunidade de realizar outras tarefas, nomeadamente auxiliar a preparação de manipulados, efetuar a conferência do receituário e a proceder à montagem de lineares. A preparação de manipulados é uma alternativa quando não existe uma formulação disponível no mercado ou quando é necessário haver ajustes da posologia em pediatria. Durante o estágio acompanhei várias preparações de manipulados, o que me permitiu relembrar algumas das técnicas aprendidas no MIFC. Também a conferência das receitas demonstrou ser uma tarefa muito importante. Ao longo de cada mês conferem-se e organizam-se as receitas por organismos, lote e número de receita. Após a correção das receitas imprime-se o verbete que tem o resumo de cada lote, anexa-se os verbetes a cada lote de receitas e procede-se ao envio dos mesmos para as entidades de participação, para que a farmácia receba o respetivo valor. A conferência das receitas permitiu-me perceber todos os aspetos que é necessário ter em atenção quando surgiam receitas no aviamento. Mais concretamente, tinha de verificar se as receitas foram corretamente dispensadas, confirmando se estavam assinadas pelo médico prescriptor e pelo utente, o número de unidades, se continham os dados referentes ao utente, a data de dispensa e carimbo, tendo em atenção o subsistema de saúde, caso se aplicasse, e eventuais exceções ou despachos relativos a participações especiais. Outra tarefa de elevada relevância que tive oportunidade de exercer foi a montagem de lineares. A promoção das vendas é realizada através da correta montagem de lineares, sendo também esta uma tarefa com elevado relevo no dia-a-dia de uma farmácia.

Para além do referido acima, adquiri conhecimentos noutras valências do trabalho em farmácia, nomeadamente no controlo de temperatura e humidade das instalações. A temperatura destes locais deve estar compreendida entre os 15 e os 25°C e o frigorífico entre os 2 e os 8°C. Relativamente à humidade relativa, esta deve ser inferior a 60%.

Em todas estas fases foi fundamental o apoio constante de toda a equipa, que demonstrou estar sempre disponível para me ajudar, transmitindo-me os seus conhecimentos e esclarecendo todas as minhas dúvidas. A boa relação entre os elementos da equipa e a forma acolhedora de como fui recebida na farmácia possibilitou-me uma ótima adaptação e uma maior aprendizagem durante o estágio.

ANÁLISE SWOT

Após a realização do estágio é importante autoavaliar esta experiência. Para este efeito realizou-se uma análise SWOT, que será apresentada de seguida através da descrição dos pontos fortes e pontos fracos do estágio, assim como das oportunidades e ameaças sentidas no decorrer do estágio.

Pontos Fortes

Um ponto forte que considero importante foi o elevado número de atendimentos diários. Poucos dias após iniciar o estágio comecei a acompanhar a Dra. Maria do Carmo nos atendimentos que realizava. Assim, foi possível estar um período de tempo considerável no atendimento ao público, o que me permitiu ganhar à vontade e confiança com os utentes. Este fator foi fundamental para a existência de um outro ponto forte, nomeadamente a capacidade de lidar com os utentes. Ao longo do estágio apercebi-me da crescente confiança dos utentes habituais da farmácia no meu trabalho. Este aspeto é crucial no desempenhar das nossas funções, pois conseguimos começar a conhecer algumas pessoas e a sua medicação e, com isso, melhorar o nosso atendimento.

Acredito que também a interação e entreaajuda entre toda a equipa foi um ponto forte. Desde o início do estágio que me senti parte da equipa, com todos os elementos dispostos a ajudar-me e a orientar-me nas diversas tarefas. A Dra. Maria do Carmo está diariamente presente na farmácia, permitindo-lhe conhecer toda a sua equipa e perceber em que tarefas cada elemento pode dar maior rentabilidade. Assim, cada um deles também me conseguia transmitir o seu máximo de conhecimento das tarefas de que eram responsáveis. Por outro lado, esta presença constante transmite confiança suficiente aos utentes para terem segurança no trabalho de qualquer um dos elementos da equipa.

Ao longo de todo o estágio tive a possibilidade de executar todas as tarefas que decorrem ao longo do dia numa farmácia. Inicialmente, realizei atividades de carácter administrativo, como a receção, conferência, armazenamento de encomendas e conferência do receituário. Esta última revelou-se muito importante para ter em atenção os erros mais comuns cometidos no atendimento quando surgiam receitas manuais, no sentido de tentar evitá-los. Por outro lado, a conferência de receituário permitiu-me conhecer diferentes subsistemas de comparticipação, bem como portarias e despachos disponíveis. Considero

que foi um ponto forte pois permitiu-me adquirir conhecimentos que, posteriormente, foram úteis no atendimento ao público.

Um elemento da farmácia Moço entrega diariamente medicamentos ao Centro de dia e lar de Almalaguês, de forma a assegurar o contínuo fornecimento de medicação a todos os utentes. Assim, um ponto forte que acredito ter auxiliado a minha aprendizagem inicial, nomeadamente facilitando o trabalho com o Sifarma 2000[®], foi a possibilidade de realizar atendimentos para estes domicílios. Tive a oportunidade de aprender a trabalhar no sistema informático sem a pressão que muitas vezes se faz sentir no atendimento. Consegui, assim, aprender calmamente todos os passos de um atendimento no Sifarma 2000[®] e, só depois, quando já sabia trabalhar com o programa é que passei para o atendimento. Isto levou a que me sentisse mais confiante quando iniciei o atendimento ao público.

A capacidade de aplicação de conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do MICF é outro ponto forte essencial. No decorrer da nossa formação temos uma vasta aprendizagem teórica que, posteriormente, se torna fundamental na aplicação prática.

Pontos Fracos

Considero que um dos pontos fracos deste estágio está relacionado com a inexperiência do aconselhamento ao utente, o que gera dúvidas e insegurança. Foi a minha primeira experiência em farmácia comunitária, pelo que nos atendimentos iniciais senti muitas incertezas quanto ao aconselhamento a transmitir aos utentes e existiram algumas situações em que tive de solicitar a ajuda dos meus colegas mais experientes.

Senti ainda alguma dificuldade na aquisição de toda a informação que é necessária para conseguir trabalhar autonomamente numa farmácia. Assim, outro ponto de fraco foi o facto de ter de assimilar tanta informação num curto espaço de tempo de modo a conseguir integrar-me na rotina da farmácia.

Acredito que um ponto fraco foi também o reduzido período de tempo em que decorreu o estágio. O trabalho em farmácia comunitária envolve inúmeros aspetos que necessitam de algum tempo para se interiorizar e conseguir aplicar no dia-a-dia. Com a realização do estágio em quatro meses, teve de haver uma aprendizagem e uma adaptação mais rápida, de forma a ser possível ter alguma autonomia, ficando com a sensação que ainda havia muito para aprender.

Oportunidades

A oportunidade que acredito ser mais relevante foi a possibilidade de aquisição de novos conhecimentos e a sua aplicação na prática diária de uma farmácia. Esta aprendizagem, juntamente com aquela previamente adquirida no MICEF, deu-me a oportunidade de conseguir aplicar as diferentes gamas de produtos existentes às necessidades de cada utente. Também foi através da aquisição destes conhecimentos que consegui adaptar-me ao dia-a-dia da farmácia e consegui tornar-me autónoma nas tarefas que realizava.

Durante o estágio foi possível ter inúmeras formações nas mais variadas áreas, desde produtos ortopédicos a cosmética ou suplementos alimentares. Toda a formação académica, juntamente com estas formações revelaram ser muitos importantes no atendimento ao público, pois só tendo conhecimento dos produtos é que os conseguimos aconselhar corretamente. Assim, outra oportunidade que obtive deste estágio foi a aprendizagem que adquiri relativamente a meias de compressão. A farmácia Moço tem uma ampla variedade de meias de compressão, sendo que é necessário ter em conta diversos aspetos quando se está a fazer o seu aconselhamento, tanto ao nível do tipo de referência mais adequado a cada necessidade, como relativamente à escolha do tamanho correto, fornecendo a meia apropriada a cada utente de forma a fomentar a sua utilização. Outra oportunidade do meu estágio foi o conhecimento que obtive na área da cosmética. A existência de uma extensa gama de cosmética revelou-se um grande desafio no início. Com as sucessivas formações de variadas marcas foi possível começar a familiarizar-me com os produtos e a aprender a aconselhá-los em diferentes situações.

Tive ainda a oportunidade de auxiliar a preparação de vários manipulados, tendo-me permitido relembrar as técnicas de manipulação estudadas no MICEF e proceder à sua aplicação na prática.

Tarefas mais simples como a medição da tensão arterial e de parâmetros bioquímicos também se revelaram uma oportunidade, uma vez que possibilitaram uma aproximação aos utentes. Com o passar do tempo esta oportunidade converteu-se numa maior segurança por parte dos utentes relativamente ao meu trabalho, sendo este fator muito importante no decorrer dos atendimentos. Também considero ter sido uma oportunidade, uma vez que foi a realização desta tarefa que suscitou o meu interesse pela preocupação dos utentes com a prevenção de doenças cardiovasculares. Este facto levou a que efetuasse uma pesquisa aprofundada sobre este tema, tendo descoberto uma proteína com eficácia no tratamento

de doenças cardiovasculares, a proteína CD47, a qual vai ser parte integrante da revisão bibliográfica que realizei no capítulo III deste documento.

Ameaças

Uma ameaça que inicialmente senti foi o facto dos utentes me considerarem desconhecida. Ocorreram algumas situações em que os utentes preferiram falar com um dos colegas, afirmando que eles já conheciam a sua história medicamentosa e devido a isso conseguiam proporcionar-lhes um melhor aconselhamento. No entanto, com o decorrer dos dias, essa ameaça inicial acabou por desaparecer, como resultado do aumento gradual da confiança dos utentes no meu trabalho.

Também considero que uma ameaça ao meu estágio foi a existência de uma enorme quantidade de produtos disponíveis para o mesmo fim, tornando-se por vezes difícil explicar aos utentes as diferenças entre cada produto e, quando era solicitado, dizer-lhes qual seria o melhor para a sua situação. Acredito que pode ser uma oportunidade pelo facto de conseguirmos apresentar várias soluções para o mesmo problema, mas por vezes acaba por causar confusão ao utente na hora de escolher.

A existência de medicamentos rateados ou esgotados dificultou o fornecimento de medicamentos aos utentes. Este aspeto tornou-se uma ameaça por não ser possível satisfazer as necessidades dos utentes, uma vez que em algumas situações não existiam alternativas terapêuticas viáveis. Quando, por vezes, existiam alternativas, alguns utentes eram pouco recetivos às mesmas por não estarem familiarizados com esses medicamentos.

As alterações consecutivas dos preços dos medicamentos também foi uma ameaça à confiança dos utentes no meu trabalho, uma vez que muitos utentes consideram que essas alterações de preço são da responsabilidade da farmácia, sendo difícil explicar aos utentes essas variações.

A diversidade de utentes que chega diariamente à farmácia também se tornou uma ameaça, na medida em que temos de adaptar a nossa linguagem para que seja de fácil entendimento para todos os utentes, o que nem sempre é fácil.

Numa farmácia em que o fluxo de utentes é diferente de dia para dia e em que as tarefas a realizar variam consoante as necessidades diárias, torna-se uma ameaça a gestão de tempo e de tarefas. Conciliar o facto de termos de priorizar tarefas, com toda a informação

que devemos ter em conta para as realizar e ainda gerir o tempo de execução das mesmas, nem sempre é fácil, adquirindo-se esta capacidade com a experiência.

INTERVENÇÃO FARMACÊUTICA

No decorrer do estágio temos a possibilidade de intervir de forma a promover o uso racional do medicamento. Em todos os atendimentos ao público existe a possibilidade de aplicar os nossos conhecimentos, assegurando o correto uso da medicação por parte dos utentes. Detetar erros de medicação, esclarecer posologias e reforçar medidas não farmacológicas, são alguns dos exemplos da importante ação exercida em farmácia comunitária graças ao contacto direto com o utente.

Nesta secção vou apresentar alguns dos casos práticos em que pude intervir ao longo do estágio.

Caso Prático I – Confusão com marca e genérico

Um utente, com cerca de 65 anos, foi à farmácia com uma receita em que tinha vários medicamentos e queria aviá-los para o irmão. Pretendia levar um medicamento de cada e realçou que não queria medicamentos genéricos. Recorri à lista de medicamentos dispensada anteriormente, a qual é possível ver no programa informático, e constatei que o utente habitualmente levava genéricos. Para facilitar, mostrei-lhe os medicamentos genéricos de que tinha registo e os respetivos medicamentos de referência. O senhor selecionou os genéricos, entre eles a Carbamazepina Generis 200mg, um fármaco com ação antiepiléptica e anticonvulsivante (RCM Carbamazepina, 2009). No entanto, escolheu também o Tegretol[®], que é um medicamento cujo princípio ativo é a carbamazepina. Ao selecionar o Tegretol[®], o senhor referiu que o irmão há uns dias atrás tinha-se sentido mal, tendo ido ao hospital, onde lhe foram feitas análises que indicaram que os níveis plasmáticos de carbamazepina estavam elevados. E, nesta sequência, referiu que a Carbamazepina Generis 200mg tinha sido utilizada para substituir outro medicamento genérico constante da receita. Analisou-se calmamente a situação e após o diálogo com o senhor ficou claro que houve um equívoco, estando o seu irmão a tomar carbamazepina e Tegretol[®] ao mesmo tempo, sendo esse o motivo de ter os níveis aumentados desse princípio ativo.

Foi explicado ao utente que Tegretol® era o medicamento de referência correspondente ao medicamento genérico carbamazepina. O senhor optou então por levar apenas o Tegretol®.

Caso Prático 2 – Uso incorreto de antibióticos

O uso de antibióticos tem vindo a generalizar-se e, por vezes, não é feita uma utilização racional desta classe de fármacos. O que se verifica frequentemente é que quando os utentes deixam de sentir os sintomas associados à infeção interrompem o tratamento, o que pode não resolver a infeção, levando a recidivas, assim como ao aparecimento de resistências bacterianas.

Uma senhora, com cerca de 30 anos, chegou à farmácia a queixar-se de uma infeção urinária. Queixava-se de disúria e micção frequente. Em conversa com ela, consegui perceber que a utente tinha tomado antibiótico (não me soube dizer qual) há duas semanas atrás, mas que em vez dos 7 dias de tratamento fez apenas 5. Expliquei então à utente que possivelmente teria sido esse o motivo de provocar o reaparecimento dos sintomas e que nesse caso o melhor seria ter aconselhamento médico para que fosse avaliada a sua situação. Adverti ainda para a importância do uso correto desta classe de fármacos.

A utente concordou, mas realçou o facto de os sintomas serem insuportáveis o que a obrigava a levar algum medicamento que, mesmo não sendo para o tratamento, pelo menos diminuísse os sintomas.

Aconselhei então Advancis® Uritabs um produto à base de arando vermelho e uva-ursina, uma associação que ajuda no alívio dos sintomas associados a infeções do trato urinário (Página Web Advancis, 2015). Realcei ainda que este produto não iria tratar a infeção e a senhora deveria ter aconselhamento médico o mais rápido possível.

Caso Prático 3 – Ter sempre em atenção a medicação habitual

Um homem, com aproximadamente 30 anos, foi à farmácia aviar medicação para o pai. Deu-me as receitas do utente em questão e disse-me os vários medicamentos que pretendia levar. Ao consultar o seu historial medicamentoso apercebi-me que um dos medicamentos anti-hipertensor que levava, Co-diovan® forte, contendo como princípio ativo

valsartan 160mg e hidroclorotiazida 25mg, não era o que se encontrava prescrito, mas sim uma dosagem inferior, valsartan 160mg e hidroclorotiazida 12,5mg, o correspondente ao Co-diovan® (RCM Co-Diovan, 2015).

Como havia registo no sistema informático deste utente adquirir o mesmo medicamento pelo menos durante o último ano, questionei se esta redução da dosagem foi proposta pelo médico ou se poderia ser um engano. O senhor respondeu que desconhecia essa alteração, reforçando que pretendia levar a medicação prescrita, de forma a evitar idas consecutivas à farmácia.

Dada a sua resposta, perguntei se a medicação era urgente ou se o utente ainda continha medicamento disponível. A esta questão o senhor respondeu que esse medicamento não era prioritário. Expliquei então que no caso de a alteração de dosagem ter sido um erro médico poderia alterar os níveis de pressão arterial do utente em causa e isso ter consequências para a sua saúde. Adverti que o mais correto a fazer seria falar com o médico para tentar saber se foi mesmo uma redução da dosagem ou se eventualmente poderia ter sido um engano. O utente concordou em confirmar com o médico a dosagem prescrita.

No dia seguinte tive a surpresa de o senhor referido acima se dirigir novamente à farmácia. Ao recordar-me da situação em causa, questionei-o se já tinha falado com o médico. Ele respondeu que na realidade foi mesmo um erro, trazendo uma nova receita com a dosagem correta do medicamento.

Caso Prático 4 – Correta utilização de dispositivos de inalação

A terapêutica inalatória é muito importante no tratamento de doenças respiratórias. Para esta terapêutica ser eficaz é necessária uma utilização correta dos dispositivos inalatórios, de forma a que o fármaco atinja o local de ação e exerça o efeito terapêutico desejado.

Uma senhora, com cerca de 45 anos, veio à farmácia com uma receita para aviar em que constava o medicamento para o controlo da asma, Brisomax Diskus® 50/250. Este contém como princípios ativos, 250mg de salmeterol, um agonista beta-2 de longa duração de ação, e 50mg de propionato de fluticasona, um corticosteroide inalado (RCM de Brisomax Diskus, 2016). Estes princípios ativos são absorvidos sistemicamente através dos

pulmões, sendo necessária uma correta inalação para que estes se depositem de forma adequada nos pulmões.

Dispensei a medicação à utente e perguntei se era a primeira vez que ia utilizar o dispositivo ou se já era medicação habitual, ao que a utente respondeu que nunca tinha utilizado. Assim, referi como se deve proceder para uma correta utilização do dispositivo. Mencionei que inicialmente devia expirar todo o ar fora, seguido da colocação do bucal e, posteriormente devia efetuar uma inspiração profunda e sustentar a respiração durante aproximadamente dez segundos. Para ser mais fácil compreender, efetuei a demonstração com os placebos existentes na farmácia. Indiquei ainda que no final era importante higienizar a cavidade bucal. Pedi à senhora para repetir o procedimento, de forma a perceber se tinha compreendido todos os passos. Por fim, reforcei a importância da correta técnica de inalação para a terapêutica ser adequada.

Caso Prático 5 – Importância de medidas não-farmacológicas

Um senhor, com cerca de 30 anos, chegou à farmácia com medicação para aviar. Ao dispensar todos os medicamentos constantes nas prescrições médicas, o utente referiu que a sua mulher estava grávida e queixava-se de irritação na garganta, tendo perguntado se havia algum medicamento que lhe pudesse dispensar.

Expliquei que devido à situação clínica da esposa, esta não devia optar por medicamentos, mas sim por opções não farmacológicas. Apresentei como alternativa a utente fazer gargarejos de água salgada, o que permitiria melhorar os sintomas sem prejudicar a saúde do bebé. Referi ainda, que caso não apresentasse melhorias deveria ter aconselhamento médico. O senhor aceitou as opções não farmacológicas e disse que iria transmitir essa informação à sua esposa.

CONCLUSÃO

O estágio na Farmácia Moço foi bastante enriquecedor, não só a nível profissional, mas também a nível pessoal, tendo-me permitido obter uma noção real da importância da profissão farmacêutica no seio da população. A farmácia comunitária é um lugar privilegiado, no sentido em que permite ter um contacto direto com a população, podendo ter uma intervenção ativa na melhoria da saúde pública.

No decorrer do estágio tive a oportunidade de perceber as diversas tarefas necessárias para o funcionamento da farmácia, o que me mostrou que o farmacêutico é um profissional multidisciplinar, pois para além dos conhecimentos técnico-científicos decorrentes da profissão tem de ter, ainda, uma forte componente de gestão e organização.

A partir da análise SWOT que fiz para este estágio, percebi que os pontos fortes foram, sem dúvida, fundamentais para toda a aprendizagem que obtive e superaram largamente os pontos fracos. Acredito que estes últimos foram aspetos que seriam superados caso o tempo de estágio fosse superior. As oportunidades e ameaças foram igualmente parâmetros que determinaram o meu crescimento ao longo do estágio.

Em conclusão, os objetivos que pessoalmente estabeleci para este estágio foram cumpridos, uma vez que graças a toda a aprendizagem obtida posso afirmar que consegui terminar o estágio com conhecimento para exercer todo o trabalho que é exigido a um farmacêutico comunitário. Para além do saber técnico, estou também grata pelos valores que me foram inculcados de promover sempre um uso racional do medicamento, tendo sempre em mente que no centro da nossa atividade está o utente.

BIBLIOGRAFIA

Página Web Advancis. 2015. [Acedido a 20 de julho de 2017]. Disponível na Internet: <http://www.advancispharma.com/pt/cuidados-femininos/advancis-uritabs/>

RCM Brisomax Diskus. 2016. [Acedido a 20 de julho de 2017]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=32350&tipo_doc=rcm

RCM Carbamazepina. 2009. [Acedido a 20 de julho de 2017]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=29588&tipo_doc=rcm

RCM Co-Diovan. 2015. [Acedido a 23 de julho de 2017]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=38480&tipo_doc=rcm

CAPÍTULO II: EMPIFARMA

INTRODUÇÃO

A distribuição farmacêutica é uma área importante no ramo das Ciências Farmacêuticas, uma vez que estabelece um elo de ligação entre os laboratórios produtores de medicamentos e locais de venda, como por exemplo farmácias. Este é um setor regulado pelo Infarmed, sujeito ao cumprimento das Boas Práticas de Distribuição e a legislação específica (Infarmed, 2015). Assim, uma empresa no setor da distribuição farmacêutica está sujeita a ter de cumprir diversos requisitos regulamentares relativamente aos processos de armazenamento e transporte de medicamentos, dispositivos médicos e medicamentos veterinários. Deve ainda dar-se especial atenção a medicamentos como estupefacientes, psicotrópicos e produtos que requerem condições especiais de temperatura, uma vez que estes são sujeitos a alguma regulamentação adicional (Infarmed, 2015).

Para o processo de distribuição farmacêutica ser eficaz é necessário que as condições com que são fornecidos os produtos sejam rigorosamente controladas. Isto só é possível se existir uma estrutura logística em que se garanta a qualidade do armazenamento e do transporte dos produtos farmacêuticos. Tal tem de ser assegurado desde a saída dos produtos dos laboratórios até à chegada às diversas entidades autorizadas para o efeito (Infarmed, 2015).

Por acreditar que a distribuição farmacêutica tem um papel crucial na cadeia do medicamento, optei por complementar o conhecimento teórico adquirido nesta área ao realizar um estágio numa empresa de distribuição grossista de produtos farmacêuticos, a Empifarma. Deste modo, apresenta-se de seguida uma descrição da aprendizagem obtida com a realização do estágio, incluindo uma análise crítica da mesma, na qual exponho tudo aquilo que considero serem pontes fortes, pontos fracos, oportunidades ou ameaças.

EMPIFARMA – PRODUTOS FARMACÊUTICOS, S.A.

A Empifarma, atualmente sediada em Montemor-o-Velho, é uma empresa de distribuição farmacêutica que opera unicamente no mercado ambulatorio em Portugal (Empifarma, 2017). Iniciou a sua atividade em Coimbra após o pedido de autorização de distribuição por grosso de medicamentos humanos, tendo mudado para as suas instalações atuais, em Montemor-o-Velho, seis anos depois.

É uma empresa destinada à distribuição diária (de medicamentos, dispositivos médicos, medicamentos veterinários, produtos cosméticos e de higiene corporal, suplementos alimentares e alimentos destinados a fim medicinais) a distribuidores por grosso, farmácias e locais de venda de medicamentos não sujeitos a receita médica (Empifarma, 2017). Deste modo, facilita a acessibilidade a produtos farmacêuticos das entidades referidas anteriormente e, conseqüentemente, possibilita o acesso dos utentes aos medicamentos ou outros produtos de que necessitem. Este setor adquire assim, uma ação fundamental na cadeia do medicamento, uma vez que garante o fornecimento, contínuo e em condições adequadas, de medicamentos e outros produtos, de forma a colmatar as necessidades da população em geral.

A Empifarma visa a implementação de uma melhoria contínua do Sistema de Gestão da Qualidade em articulação com as Boas Práticas de Distribuição, com a norma NP EN ISO 9001:2015 e com os Decretos-Lei enquanto legislação aplicável ao Estatuto do Medicamento, dispositivos médicos e medicamentos e produtos de uso veterinário (Empifarma, 2017).

O Sistema de Gestão da Qualidade fundamenta-se numa abordagem por processos, otimizando o seu controlo, de forma a existir um correto fornecimento de produtos e serviços para a satisfação dos clientes (Infarmed, 2015). Esta abordagem permite uma gestão mais focalizada em cada processo, o que favorece a obtenção de melhores resultados. Todos os processos estão definidos em fichas, nas quais está referida a sua finalidade, as atividades a realizar e os respetivos responsáveis. Para além dos processos, são ainda descritos os procedimentos que correspondem aos respetivos processos. Em cada procedimento estão descritos os objetivos e a forma como devem ser executados.

ESTÁGIO CURRICULAR

O início do estágio na Empifarma visou o acompanhamento dos diferentes processos que decorrem na empresa. Comecei por verificar o funcionamento do processo de receção de mercadorias. Neste é importante assegurar que os fornecedores da mercadoria recebida são devidamente autorizados por parte do Infarmed. Deve-se ainda confirmar que toda a mercadoria recebida foi a solicitada e analisar a mercadoria de forma a perceber se não foi perdida a sua integridade durante o transporte. Por fim, é essencial garantir que os medicamentos que requerem condições especiais de temperatura, nomeadamente produtos que precisam de ser armazenados a baixas temperaturas (entre 2 a 8°C), são rapidamente encaminhados para os devidos locais de armazenamento.

Outro processo que tive a oportunidade de acompanhar foi a conferência de mercadorias. Neste deve garantir-se que os produtos são provenientes dos fornecedores autorizados, que correspondem aos da encomenda, que estão nas quantidades e preços corretos e ainda que as embalagens mantiveram a sua integridade. Adicionalmente deve ter-se em atenção se há produtos que requerem condições especiais de temperatura, devendo estes ser conferidos em primeiro lugar, de forma a rapidamente serem colocados nos locais específicos de armazenamento. Quando se conferem produtos novos, verificam-se os aspetos referidos anteriormente juntamente com as dimensões da caixa, o peso e o número de unidades de cada caixa. Uma unidade de cada novo produto é verificada pela direção técnica de forma a verificar a conformidade da rotulagem e também a descrição no sistema informático.

Seguidamente foi possível acompanhar os processos de aviamento, ou seja, a preparação das encomendas e a colocação das mesmas na área de expedição para serem depois transportadas aos respetivos locais de destino. A preparação de encomendas pode ser efetuada por aviamento manual ou aviamento automático, dependendo do tipo de cliente. Realiza-se aviamento manual quando as encomendas se destinam a armazéns grossistas, e aviamento automático quando os clientes são farmácias, parafarmácias, clínicas ou locais de venda de medicamentos não sujeitos a receita médica. Existem dois tipos de aviamento automático, o qual é definido consoante a rotatividade dos produtos. Produtos com maior rotatividade são armazenados num sistema automatizado e são dispensados automaticamente para uma banheira¹ que depois segue para a área de expedição. Por outro

¹Banheira- contentor utilizado para acondicionar os produtos farmacêuticos de forma a estes serem transportados aos clientes.

lado, os produtos restantes são dispensados manualmente por colaboradores, os quais seguem as instruções de um sistema controlado por voz. No caso de medicamentos e produtos que requerem um armazenamento a baixas temperaturas, estes devem ser colocados numa banheira isolada com caixas térmicas próprias para o efeito. O aviamento tem duas estações de controlo para onde a banheira é desviada caso alguma quantidade não tenha sido satisfeita. Nestas estações existem colaboradores que procedem à investigação e correção da situação. Este controlo é um fator chave para a correta preparação de encomendas.

A Direção Técnica, área do meu estágio, regula estes processos e garante que em todos eles se cumprem as boas práticas de distribuição. Uma forma de verificar se todos os processos são a ser cumpridos convenientemente é através da realização de auditorias. Estas permitem ainda detetar possibilidades de melhoria que poderão ser posteriormente implementadas de forma a otimizar o processo. No decorrer do estágio tive a oportunidade de preparar fichas de verificação, as quais são efetuadas baseando-se nas boas práticas de distribuição, no que está determinado para cada processo e nos contratos estabelecidos com outras entidades, caso existam. Estas fichas são utilizadas durante a auditoria para avaliar todos os aspetos relevantes ao serviço. Após a realização dessas fichas, acompanhei as auditorias que foram efetuadas a entidades subcontratadas pela Empifarma, nomeadamente ao serviço de atendimento de chamadas telefónicas e a diferentes transportadoras. Quanto ao atendimento de chamadas telefónicas, este destina-se a aceitar encomendas através de contacto telefónico. Esta atividade deve ser regulada, de forma a que se realize de forma adequada, levando à satisfação das necessidades dos clientes e ao potenciamento das vendas. No caso do transporte de encomendas, este é crucial para que os clientes recebam as mercadorias que encomendaram em bom estado.

Existem ainda outras atividades que são realizadas pela direção técnica, nomeadamente a garantia de que são mantidas as condições de temperatura e humidade dos locais de armazenamento, e ainda, ter em atenção eventuais recolhas de mercado. A temperatura das instalações gerais deve estar compreendida entre os 15 e os 25°C, e o armazenamento refrigerado entre os 2 e os 8°C. A humidade relativa deve ser inferior a 60%. É essencial que existam equipamentos adequados à manutenção da temperatura e humidade dentro destes valores, de forma a garantir a qualidade dos produtos. No caso das circulares de recolhas de mercado, estas podem ser criadas pelos laboratórios ou pelo Infarmed. Após a receção de uma circular deve-se confirmar se existe o produto em stock ou se alguma vez foi vendido pela Empifarma. Caso exista o produto, deve proceder-se à sua

recolha para uma localização devidamente separada. Se, por outro lado, não exista em stock, mas já foi vendido pela empresa, contactam-se os clientes para que estes procedam à recolha dos produtos.

ANÁLISE SWOT

Seguidamente apresenta-se uma reflexão crítica que foi efetuada tendo em conta uma análise interna, a qual inclui pontos fortes e pontos fracos, e uma análise externa, oportunidades e ameaças, do estágio realizado.

Pontes Fortes

Um ponto forte que considero ter facilitado a minha integração foi a existência de um plano de estágio adequado. Esta foi a primeira experiência que tive em distribuição grossista de medicamentos, pelo que não tinha noção da amplitude de uma empresa como a Empifarma e de como os processos devem estar interligados de forma a que o trabalho final seja eficaz. Inicialmente, adquiri conhecimento acerca do modo de funcionamento de toda a empresa através do acompanhamento de vários processos que decorrem na Empifarma. Este método permitiu-me conhecer não só o trabalho que é desempenhado em cada processo, mas também os colaboradores da empresa, facilitando a minha adaptação.

Posteriormente foi possível acompanhar de perto o trabalho da diretora técnica, desde a gestão dos vários processos à realização de auditorias e autoinspeções. Para além de acompanhar a minha orientadora na realização de auditorias internas, ainda tive a oportunidade de estar presente em auditorias de entidades externas à Empifarma, nomeadamente o Infarmed. Assim, fui capaz de perceber as exigências desta entidade, obrigando a direção técnica, não só a coordenar e orientar todos os processos, mas também a conferir a sua exequibilidade. Estas competências que me foram transmitidas constituíram também um ponto forte deste estágio. Adquiri ainda conhecimentos sobre produtos e substâncias perigosas, através da realização de um trabalho interno com o intuito de dar a conhecer aos colaboradores, que têm contacto com esses produtos, os significados dos símbolos de perigo, as incompatibilidades dos produtos e as precauções que devem ter no seu manuseamento.

O bom ambiente de trabalho que senti na Empifarma também facilitou a minha integração. Todos os colaboradores da empresa mostraram-se sempre disponíveis em ajudar-me, incluindo a diretora técnica, que apesar de todo o trabalho de que é responsável mostrou-se sempre disponível para me apoiar em todas as tarefas e esclarecer todas as minhas dúvidas. Este foi sem dúvida um enorme ponto forte do meu estágio.

Pontos Fracos

Considero que um ponto fraco decorrente do estágio foi a pouca aplicação de conhecimentos científicos adquiridos no MICEF. O trabalho em direção técnica de um armazém de distribuição grossista tem uma forte componente de gestão e logística, sendo a vertente científica menos aplicada no dia-a-dia.

A duração do estágio foi de apenas três meses, o que acredito não ter sido suficiente para aprender todo o trabalho que compete à direção técnica. Houve alguns processos que não tive a oportunidade de acompanhar por não ter tido tempo, o que considero que também foi um ponto fraco.

Oportunidades

Este estágio possibilitou-me a oportunidade de conhecer uma saída profissional que o curso de Ciências Farmacêuticas oferece. Para além de ter ficado a compreender o funcionamento global de uma empresa de distribuição de medicamentos, adquiri uma forte noção da gestão e logística que este trabalho implica de forma a ser realizado eficazmente.

No decorrer do estágio tive a oportunidade de ter contacto com os novos produtos que chegavam à Empifarma. Um exemplar de cada novo produto deve ser localizado numa área do gabinete da direção técnica para ser alterada a sua designação de modo a uniformizar todos os nomes dos produtos. Assim, esta tarefa possibilitou-me conhecer uma vasta gama de medicamentos, dispositivos médicos, medicamentos veterinários, produtos cosméticos e de higiene corporal, suplementos alimentares e alimentos destinados a fim medicinais que são vendidos pela Empifarma.

Ameaças

O trabalho de um farmacêutico em distribuição por grosso de medicamentos está muito direcionado para gestão de processos e recursos humanos. Desta forma, uma ameaça que senti foi os poucos conhecimentos de gestão que temos como formação de base do MICE.

A direção técnica deve assegurar a qualidade das atividades desenvolvidas de um modo efetivo e de forma permanente, o que requer um trabalho contínuo na otimização de processos. Deste modo, a falta de experiência inicial não me permitiu ter autonomia suficiente para realizar as tarefas propostas, o que considerei ser uma ameaça, pois para tomar algumas decisões necessitava de uma opinião por parte da minha orientadora.

CONCLUSÃO

Como a Empifarma é uma empresa destinada à distribuição por grosso de medicamentos e produtos farmacêuticos tem um papel essencial na cadeia de abastecimento. Para este processo de distribuição ser eficaz é necessário o cumprimento de um Sistema de Gestão de Qualidade aliado às Boas Práticas de Distribuição. Devem ser estabelecidos os processos e respetivas responsabilidades, assim como efetuar uma avaliação da gestão dos riscos para a qualidade. Deste modo, é necessário que haja uma monitorização da eficácia destes processos, sendo uma tarefa desempenhada pela direção técnica.

Em modo de conclusão, este estágio foi muito enriquecedor, tendo-me permitido perceber que o farmacêutico nesta área deve ter conhecimentos consolidados acerca do Sistema de Gestão da Qualidade e das Boas Práticas de Distribuição, pois estes são fundamentais no dia-a-dia de uma empresa de distribuição. Para além destes conhecimentos, é necessária uma grande noção de gestão e logística, pois são vários os processos que decorrem na Empresa.

BIBLIOGRAFIA

EMPIFARMA – **Empresa**. [Acedido a 30 de julho de 2017]. Disponível na Internet: <http://www.empifarma.pt/site/empresa>

INFARMED – **Deliberação n.º 047/CD/2015 - Regulamento relativo às boas práticas de distribuição de medicamentos para uso humano**. 19 de março de 2015. [Acedido a 31 de julho de 2017]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/11048532.PDF/4bde6495-b33d-4311-8302-784be4a65971>

**CAPÍTULO III: A PROTEÍNA CD47 NO CANCRO, DOENÇAS
CARDIOVASCULARES E IMPORTÂNCIA DO SEU BLOQUEIO NA
ATEROSCLEROSE**

RESUMO

A glicoproteína de membrana CD47 (grupo de diferenciação 47) pertence à superfamília das imunoglobulinas e é expressa globalmente à superfície das células. Esta tem um papel fundamental no sistema imune, através da sua interação com o sinal regulador da proteína alfa (SIRP α). Esta interação pode regular a ação de células fagocíticas, como os macrófagos. Assim, o reconhecimento de CD47 pelo seu recetor SIRP α , expresso em macrófagos, inicia uma cascata de desfosforilações que tem como resultado final a inibição da fagocitose da célula hospedeira.

CD47 é altamente expressa à superfície de células tumorais, o que impede estas células de serem eliminadas pelo sistema imune. Deste modo, é crucial investigar o potencial dos anticorpos anti-CD47 como alvos terapêuticos de diferentes neoplasias, sendo que o bloqueio desta interação mostrou induzir respostas antitumorais.

Para além desta interação, CD47 funciona como recetor para a trombospondina-I. Esta atua através de CD47 regulando a sinalização de óxido nítrico (NO). Assim, antagoniza os efeitos de NO, limitando a sua atividade angiogénica e a sua capacidade de vasodilatação das células do músculo liso.

À semelhança do que se observa nas células tumorais, a aterosclerose está também associada a uma sobre-expressão de CD47 e é a principal causa de doença cardiovascular. Isto deve-se ao facto de CD47 inibir um processo fagocítico (eferocitose) que elimina células danificadas ou mortas, com a consequente acumulação destas células. A utilização de anticorpos anti-CD47 demonstrou normalizar a eliminação destas células danificadas e, assim, ser uma alternativa terapêutica viável para esta patologia.

Palavras-chave: CD47, SIRP α , trombospondina-I, fagocitose, cancro, NO, doenças cardiovasculares, aterosclerose, anticorpo.

ABSTRACT

The membrane glycoprotein CD47 (cluster of differentiation 47) belongs to the immunoglobulin superfamily and is expressed ubiquitously at the cell's surface. It plays a key role in the immune system, through the signal regulatory protein alpha (SIRP α) interaction. This one may regulate the action of phagocytic cells, such as macrophages. Thus, recognition of CD47 by its SIRP α receptor expressed on macrophages initiates a phosphorylation's cascade which ends with the inhibition of host cell phagocytosis.

CD47 is highly expressed on the surface of tumor cells, which prevents these cells from being eliminated by the immune system. So, it is crucial to investigate the potential therapeutic application of anti-CD47 antibodies as therapeutic targets for different diseases. Blocking this interaction has been shown to induce antitumor responses.

In addition to this interaction, CD47 functions as a receptor for thrombospondin-I. This one acts through CD47 regulating nitric oxide (NO) signaling. Thus, it antagonizes the effects of NO by limiting its angiogenic activity and preventing smooth muscle cells vasodilation.

As observed in tumor cells, atherosclerosis, the main cause of cardiovascular disease, is associated with an overexpression of CD47. CD47 inhibits a phagocytic process (efferocytosis) that eliminates damaged or dead cells with consequent accumulation of these cells. The use of anti-CD47 antibodies has shown to normalize the clearance of these damaged cells and consequently, be a viable therapeutic alternative for this pathology.

Key-words: CD47, SIRP α , thrombospondin-I, phagocytosis, cancer, NO, cardiovascular diseases, atherosclerosis, antibody.

INTRODUÇÃO

Num organismo multicelular, as células interagem entre si ou com diversas moléculas, de forma a regular as suas funções, garantindo a homeostase intracelular. Assim, as células podem comunicar através da secreção de citocinas ou através da expressão de uma molécula de sinalização à superfície das células, que por sua vez liga a recetores nas células adjacentes (Oldenborg, 2012). A interação entre o grupo de diferenciação 47 (CD47) e o sinal regulador da proteína alfa (SIRP α) é um exemplo de uma comunicação célula a célula. CD47 é uma proteína expressa globalmente à superfície das células. Através da sua interação com SIRP α , glicoproteína da superfície celular, é possível o controlo da fagocitose por células fagocíticas, como os macrófagos (Liu *et al.*, 2017^c). Esta interação desempenha um papel crucial em várias patologias, nomeadamente em neoplasias, uma vez que CD47 para além de ser expressa em células normais, é altamente expressa em células cancerígenas. Devido a esta elevada expressão, CD47 liga-se a SIRP α existente à superfície de macrófagos, inibindo a fagocitose das células cancerígenas, levando à progressão do tumor (Kong *et al.*, 2015). Assim, a interação CD47/SIRP α tem sido investigada como um novo alvo para o tratamento de neoplasias malignas. A utilização de anticorpos bloqueadores desta interação mostrou resultados relevantes, uma vez que nos casos em estudo, houve diminuição dos tumores e do aparecimento de metástases (Gao *et al.*, 2017).

A homeostase cardiovascular é garantida através do equilíbrio entre o fluxo sanguíneo e a interação dos componentes celulares dos vasos sanguíneos, como o óxido nítrico (NO). A falha dos mecanismos de manutenção da homeostase, com a diminuição do fluxo sanguíneo e consequente diminuição da perfusão dos tecidos, está na etiologia das doenças cardiovasculares, sendo até consideradas a principal causa de morte em todo o mundo (Rogers *et al.*, 2014). O endotélio vascular regula o tónus dos vasos sanguíneos através da produção de NO. Este biogás estimula o relaxamento das células musculares vasculares lisas aumentando o fluxo sanguíneo (Isenberg *et al.*, 2009^b).

Para além de ser um ligando para o recetor SIRP α , CD47 funciona também como um recetor para a proteína trombospondina-I. Esta última é uma proteína com a capacidade de inibir a produção de NO, antagonizando os seus efeitos fisiológicos. Verificou-se que é através da interação com CD47 que a trombospondina-I limita a sinalização de NO. Assim, é importante considerar a interação de CD47/trombospondina-I como um potencial alvo

terapêutico, de forma a melhorar o tratamento das doenças cardiovasculares (Bauer *et al.*, 2010).

Devido à enorme importância das interações de CD47 em diversas patologias que afetam o ser humano, pretende-se com este trabalho de revisão bibliográfica ficar a conhecer as associações de CD47 que têm relevância no cancro e em doenças cardiovasculares, nomeadamente, a importância do seu bloqueio na aterosclerose. Discutiremos, ainda, esta molécula como um potencial agente terapêutico no tratamento destas patologias.

CD47

Estrutura e Função

CD47 foi a primeira proteína identificada como sendo uma glicoproteína transmembranar associada a integrinas. Pertencente à família das imunoglobulinas, a proteína CD47 apresenta uma massa molecular de aproximadamente 50KDa e é globalmente expressa à superfície das células (Okazawa *et al.*, 2005).

Inicialmente, CD47 foi reconhecida como uma proteína da membrana envolvida na sinalização mediada pela integrina $\alpha_v\beta_3$ em neutrófilos. No entanto, atualmente sabe-se que esta proteína também é expressa em células que não expressam integrinas, como é o caso dos eritrócitos (Oldenborg, 2012).

CD47 consiste num domínio extracelular amino-terminal (NH₂-terminal) semelhante a imunoglobulina-V, cinco domínios transmembranares e uma região carboxi-terminal intracelular curta (Fig. 1) (Okazawa *et al.*, 2005).

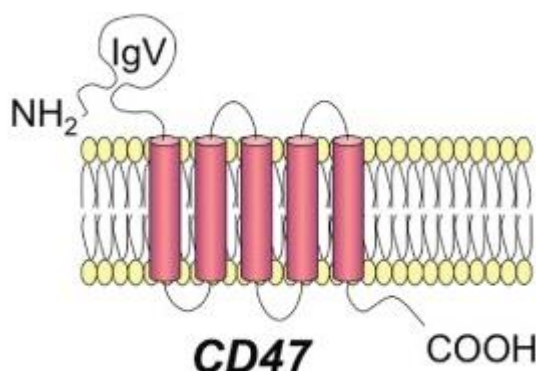


Fig. 1 – Representação esquemática da proteína CD47. CD47 é uma proteína constituída por um domínio extracelular NH₂-terminal semelhante à imunoglobulina, cinco domínios transmembranares e por uma região carboxi-terminal intracelular (adaptado de Sick *et al.*, 2012).

Podem distinguir-se quatro isoformas de CD47, sendo que estas diferem apenas no comprimento da região terminal citoplasmática. A isoforma 2, contendo cerca de 16 aminoácidos, é a isoforma predominante, sendo expressa em todas as células de origem hematopoiética, células endoteliais e epiteliais (Reinhold *et al.*, 1995). Por outro lado, a isoforma 4, com 36 aminoácidos, encontra-se principalmente em neurónios. Também a isoforma 3 de CD47 é encontrada em células neuronais e pensa-se que esteja envolvida na retenção da memória. Apenas os queratinócitos apresentam quantidades significativas da

isoforma I (Reinhold *et al.*, 1995). Porém, existe pouca informação acerca das diferenças nas funcionalidades da proteína que representam cada uma destas variantes (Oldenborg, 2012).

Apesar de ter sido inicialmente reconhecida como uma proteína envolvida na sinalização mediada por integrinas, sabe-se hoje que CD47 tem outras importantes interações, nomeadamente com a trombospondina-1, SIRP α , entre outras. Estas interações regulam diversas funções celulares incluindo a migração celular, produção de citocinas e a ativação de células T. Contudo, estudos recentes têm-se focado na interação CD47/SIRP α pelo seu importante papel na inibição da fagocitose (Liu *et al.*, 2017^c).

CD47 é então uma proteína transmembranar que funciona como recetor para a trombospondina-1 e como ligando para SIRP α (Gao *et al.*, 2017), cujas interações são descritas a seguir.

Interação CD47/SIRP α

A família SIRP é constituída por diferentes recetores com funções distintas. Um recetor inibitório, SIRP α , um recetor de ativação, SIRP β 1, e um recetor não sinalizante, SIRP γ (Fig. 2A). Podem ainda distinguir-se outros recetores, mas ainda não se encontram caracterizados, como é o caso do SIRP δ e SIRP β 2 (Brooke *et al.*, 2004). SIRP γ interage com CD47 com uma afinidade cerca de dez vezes menor do que a interação do SIRP α . SIRP β 1 apresenta diferenças na região do sítio de ligação relativamente ao SIRP α , sendo que por isso não apresenta uma ligação significativa a CD47 (Fig. 2A) (Brooke *et al.*, 2004).

SIRP α é um recetor transmembranar da superfamília das imunoglobulinas. Contém três domínios semelhantes à imunoglobulina, uma região transmembranar e uma região citoplasmática que possui quatro resíduos de tirosina com motivos de inibição do recetor baseado em tirosina (Fig. 2A) (Barclay and Berg, 2014).

CD47 é expressa em todas as células, enquanto SIRP α é expresso em macrófagos, granulócitos, células dendríticas, neurónios e células endoteliais (Kong *et al.*, 2015). CD47 contém cinco regiões transmembranares juntamente com um único domínio semelhante a imunoglobulina que interage com o domínio NH₂- terminal de SIRP α (Barclay and Berg, 2014).

A interação CD47/SIRP α é fundamental em várias funções celulares, tais como na regulação do sistema imunitário, através do qual participa na homeostase dos linfócitos e na ativação e maturação de células dendríticas, regulando ainda células do sistema nervoso (Oldenborg, 2012).

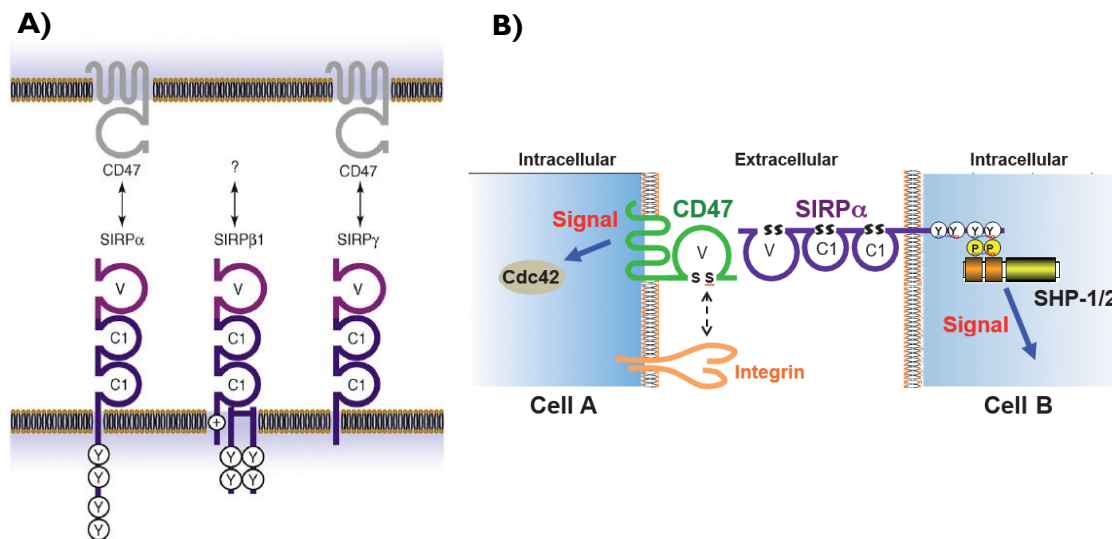


Fig. 2 – Interações entre SIRP e CD47. **A)** Representação esquemática dos membros da família SIRP e das suas respetivas interações a CD47. CD47 está definido como um ligando de SIRP α e SIRP γ , sendo que ainda não foi identificado um ligando de SIRP β 1. Apesar de SIRP β 1 e SIRP γ terem três domínios semelhantes à imunoglobulina na região extracelular, tal como SIRP α , as estruturas das suas regiões citoplasmáticas são bastante diferentes da SIRP α . “Y” representa os locais de ligação de tirosina (Matozaki *et al.*, 2009). **B)** Interação CD47/SIRP α . Através da ligação entre os locais de tirosina de SIRP α e as tirosinas fosfatases SHP-1 e SHP-2, há ativação destas fosfatases. A interação CD47/SIRP α ocorre através do domínio N-terminal extracelular semelhante a imunoglobulina-V de SIRP α e o domínio semelhante a imunoglobulina-V de CD47. Esta interação promove a fosforilação dos locais de tirosina de SIRP α , ativando SHP-1 e SHP-2. O domínio semelhante a imunoglobulina-V de CD47 é ligado por uma ligação dissulfureto (adaptado de Isenberg *et al.*, 2009^a; Murata *et al.*, 2014).

Quando ocorre a fosforilação dos locais de tirosina, da região citoplasmática de SIRP α , há ativação da proteína tirosina fosfatase-1 (SHP-1) ou proteína tirosina fosfatase-2 (SHP-2) -tirosinas fosfatases que contêm um domínio SH2 (Fig. 2B) (Murata *et al.*, 2014). Esta fosforilação é desencadeada por diversos fatores de crescimento e citocinas. SHP-1 é maioritariamente expressa em células hematopoiéticas e regula negativamente diversas funções destas células, enquanto SHP-2 é expressa na generalidade das células, e contribui para o controlo positivo do crescimento e migração celular. Assim, em resposta a diferentes estímulos extracelulares, SIRP α contribui para recrutar e ativar SHP-1 e SHP-2 (Murata *et al.*, 2014).

CD47 funciona como um ligando para SIRP α , sendo que a interação ocorre entre o domínio NH₂-terminal de SIRP α e o único domínio N-terminal de CD47 (Fig. 2B). Esta interação desencadeia a fosforilação dos motivos de inibição dos imunoreceptores baseados em tirosina de SIRP α , o que leva ao recrutamento de SHP-1 e SHP-2 para a membrana da célula, os quais causam a desfosforilação específica de alguns substratos que medeiam diversos efeitos fisiológicos (Fig. 2B) (Barclay and Berg, 2014). Quando esta interação ocorre em fagócitos, como os macrófagos, há a indução de um sinal negativo, resultando na inibição da acumulação de miosina à superfície da célula, levando entre outros efeitos, à inibição da fagocitose (Tsai and Discher, 2008).

Interação CD47/trombospondina-I

Trombospondina é uma glicoproteína funcional da matriz celular. Originalmente, foi descoberto que era produzida e armazenada apenas pelos grânulos de plaquetas e libertava-se quando ocorria a ativação destas (Li *et al.*, 2002; Rogers *et al.*, 2014). Mais tarde, reconheceu-se que era também formada e secretada, em resposta ao *stress*, por células do músculo liso vascular, células endoteliais e epiteliais, fibroblastos e queratinócitos (Isenberg *et al.*, 2009^b). Quando ativadas por citocinas pro-inflamatórias, as células dendríticas, os macrófagos e as células T produzem também trombospondina (Li *et al.*, 2002).

CD47 demonstrou interagir com diferentes membros da família da trombospondina, mais especificamente com trombospondina -1,-2 e -4. No entanto, estudos indicam que as interações com a trombospondina-2 e a trombospondina-4 são de baixa afinidade, sendo a trombospondina-I o ligando do recetor CD47 que apresenta superior força de interação (Isenberg *et al.*, 2009^a). O domínio extracelular semelhante a imunoglobulina de CD47 funciona como um recetor para o domínio de ligação C-terminal da trombospondina-I (Oldenburg, 2012). Esta interação inibe a sinalização de NO, um importante mediador da transdução intracelular (Fig. 3) (Isenberg *et al.*, 2009^b).

A ação do NO deve-se à ativação de isoformas solúveis de guanilato ciclase, aumentando os níveis de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), resultando na ativação de proteína cinase dependente de GMPc (Rogers *et al.*, 2014). Assim, a acumulação de GMPc devida à ativação da isoforma solúvel de guanilato ciclase, estimulada pelo NO, causa a desfosforilação da cadeia leve de miosina II, levando ao relaxamento das células do músculo vascular liso (Isenberg *et al.*, 2009^a). O NO minimiza a adesão de células inflamatórias à

parede vascular, diminuindo a ativação de plaquetas, e promove o relaxamento das células do músculo liso vascular, levando ao aumento do fluxo sanguíneo (Isenberg *et al.*, 2009^a).

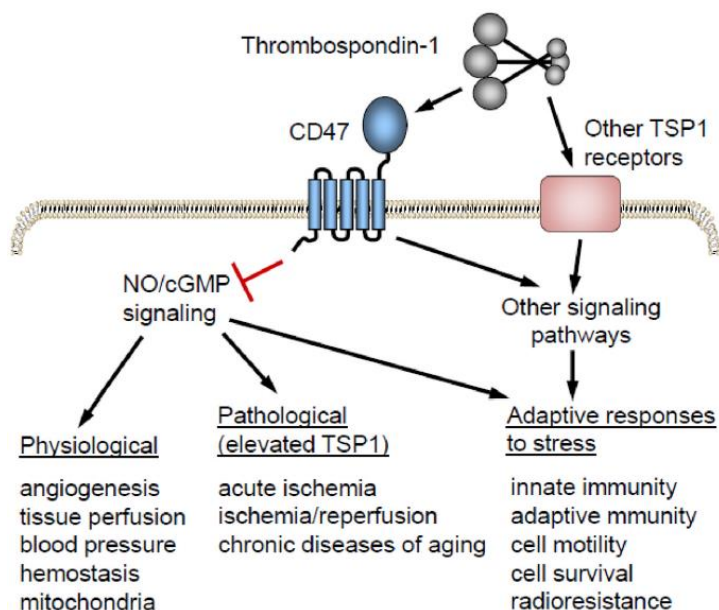


Fig. 3 – Representação da interação entre o ligando trombospodina-I e o seu recetor CD47, bem como da interação da trombospodina-I com outros recetores. A trombospodina-I é um fator autócrino libertado pelas plaquetas promovendo a homeostase. Níveis fisiológicos da trombospodina-I diminuem a sinalização de NO/GMPc através da interação com CD47. Esta diminuição limita parcialmente a pressão sanguínea e a perfusão dos tecidos e controla a biogénese mitocondrial. Por outro lado, várias condições patológicas causam um aumento agudo ou crónico da trombospodina-I, contribuindo para um défice de NO/GMPc associado a isquémia e a doenças crónicas. A sinalização da trombospodina-I através de outros recetores tem também um papel significativo nas respostas adaptativas ao stress (adaptado de Roberts *et al.*, 2012).

Assim, a inibição do NO por trombospodina-I origina a diminuição da síntese de GMPc e a ativação de proteína cinase dependente de GMPc, antagonizando o papel de NO na manutenção da pressão sanguínea e da homeostase das plaquetas (Fig. 3) (Isenberg *et al.*, 2009^b).

Estudos em animais que não possuem trombospodina-I ou CD47 demonstraram que estes apresentam um aumento do fluxo sanguíneo nos tecidos em resposta ao NO, aumentando a sobrevivência dos tecidos sob condições de isquémia (Isenberg *et al.*, 2009^b).

CD47 e o Sistema Imunitário Inato

Os macrófagos desempenham uma importante função na resposta imunitária inata devido à sua capacidade de internalizar e degradar agentes patogénicos. A sua função traduz-se no reconhecimento e eliminação de células estranhas ao organismo, danificadas ou envelhecidas, através da fagocitose. Assim, contribuem para a manutenção da homeostase intracelular (Okazawa *et al.*, 2005).

O sistema imune reconhece agentes patogénicos como invasores, ou porque estes expressam determinantes que estão ausentes nas células hospedeiras ou porque eles não possuem auto-marcadores, tais como CD47, que normalmente estão presentes nas células hospedeiras (Oldenborg *et al.*, 2000). Os macrófagos nunca exercem estes efeitos sobre células normais. Isto deve-se à interação de CD47 e SIRP α à superfície dos macrófagos, a qual origina um sinal inibitório que impede a fagocitose das células alvo (Okazawa *et al.*, 2005).

O papel da interação CD47/SIRP α foi inicialmente identificado em estudos *in vivo*, nos quais se verificou que eritrócitos que não expressavam CD47 (CD47^{-/-}) eram eliminados em poucas horas. Contrariamente, glóbulos vermelhos que possuíam CD47 mantinham-se na circulação sanguínea durante 60 a 80 dias (Oldenborg *et al.*, 2000).

Foi demonstrado que a proteína CD47 está diminuída em células apoptóticas, levando à inexistência da inibição potenciada pela interação CD47/SIRP α (Takizawa and Manz, 2007). Por exemplo, com o passar do tempo os eritrócitos vão perdendo a expressão de CD47 e esta perda de expressão parece ser o principal fator desencadeante da eliminação dos eritrócitos envelhecidos através da fagocitose por macrófagos (Takizawa and Manz, 2007). Assim, pode-se afirmar que a eliminação de células envelhecidas parece ser uma ação importante desencadeada pela interação CD47/SIRP α (Okazawa *et al.*, 2005).

A ligação de SIRP α presente em monócitos humanos e CD47 em eritrócitos mostrou regular negativamente a fagocitose devido à desfosforilação de miosina-IIA, uma molécula chave da fagocitose (Murata *et al.*, 2014). CD47 foi então identificado como um auto-marcador ou como um sinal que atua impedindo a eliminação homeostática de eritrócitos (Barclay and Berg, 2014).

Consistentemente, estudos recentes identificaram que células estaminais hematopoiéticas, que apresentavam sobre-expressão de CD47, conseguiam evitar a

eliminação pelo sistema imunitário inato (Fig. 4). No entanto, células estaminais hematopoiéticas que não expressavam CD47 eram rapidamente eliminadas por macrófagos (Fig. 4) (Jaiswal *et al.*, 2009).

Para além disso, as células fagocíticas sofrem ativação quando encontram uma partícula, organismo ou célula que não expressa CD47, ou quando CD47 de outra espécie não reage de forma cruzada com o hospedeiro SIRP α , levando à sua eliminação. Conjuntamente, estas evidências demonstram o papel fundamental que CD47 desempenha na resposta da imunidade inata, uma vez que determina o destino das células (Takizawa and Manz, 2007).

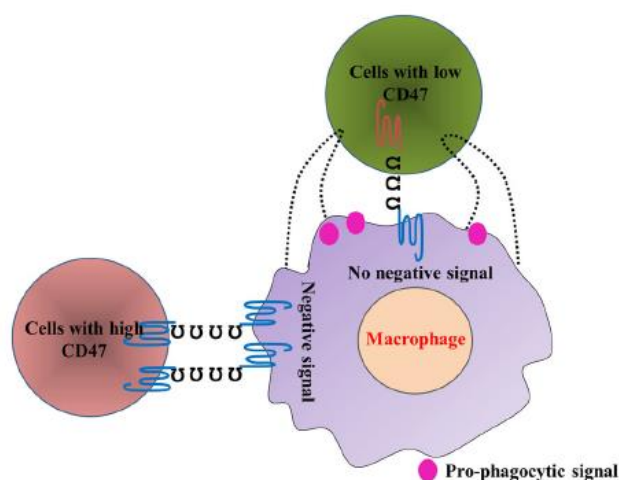


Fig. 4 – O papel de CD47 em macrófagos. CD47, expressa à superfície da grande maioria das células, interage com SIRP α e envia um sinal negativo aos macrófagos de forma a inibir a fagocitose dessas células. Células com baixo nível de expressão de CD47 são eliminadas pelos macrófagos (adaptado de Kong *et al.*, 2015).

CD47 E CANCRO

CD47 é considerado um marcador de si próprio, sendo normalmente sobre-expresso na superfície de células cancerígenas de várias linhas celulares, como células de leucemia, células iniciadores de tumores da bexiga e linfomas. Assim, o reconhecimento de CD47 pelo seu recetor, SIRP α expresso em macrófagos, inibe a fagocitose das células cancerígenas pelos macrófagos (Wang *et al.*, 2013). A expressão de CD47 parece ser um fator de prognóstico adverso em tumores com um nível de expressão de CD47 relativamente alto. De facto, apresenta pior prognóstico quando comparado com outros tumores em que o nível de expressão de CD47 é mais baixo (Barclay and Berg, 2014). A expressão de CD47, em células de tumores sólidos e, especialmente, em células estaminais cancerígenas, é sugerida por vários estudos como o mecanismo através do qual estas células

se protegem da fagocitose. Deste modo, permite a proliferação do tumor e o aparecimento de metástases tumorais (Liu *et al.*, 2017^a).

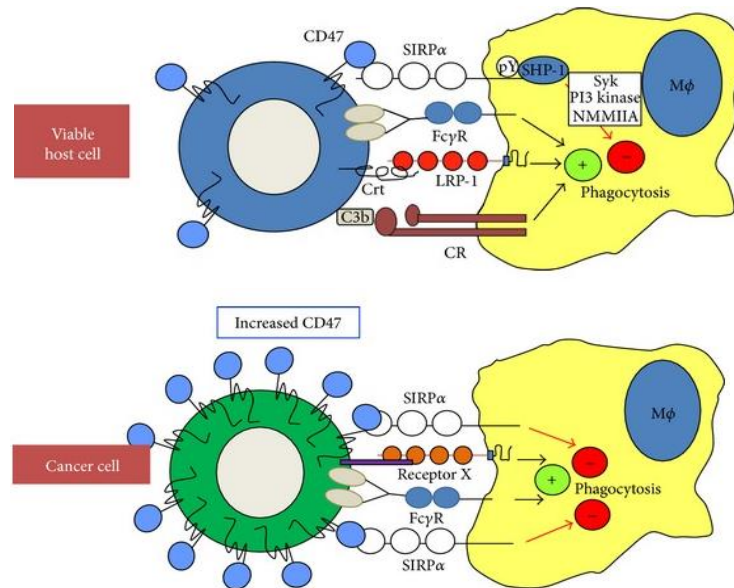


Fig. 5 – O processo de fagocitose é regulado pela interação entre CD47 e SIRP α . A interação de CD47 expressa numa célula normal com SIRP α de uma célula fagocítica (por exemplo, macrófago (M ϕ)), induz a fosforilação das sequências de inibição dos imunoreceptores baseados em tirosina havendo recrutamento de SHP-1 para a membrana da célula. Isto causa a inibição da sinalização profagocítica através de recetores Fc γ , recetores do complemento (CR) ou LRP-1 (recetor *scavenger*). A inibição da fagocitose pode também envolver a sinalização através da tirosina cinase Syk e fosfoinositídeo 3-quinase (PI3 kinase) e inibição de miosina IIA não muscular (NMMIIA). Nas células cancerígenas há aumento da expressão de CD47 de forma a inibir a fagocitose através da interação com SIRP α , e também inibir a fagocitose mediada por recetores Fc γ e outros recetores profagocíticos (recetor x) (adaptado de Oldenborg, 2012).

As células estaminais cancerígenas são um pequeno subconjunto de células cancerígenas, com a capacidade de construir um reservatório de células cancerígenas autossustentável, uma vez que se conseguem autorrenovar e, assim, permitem a manutenção da massa tumoral (Liu *et al.*, 2017^a). O papel deste tipo de células é importante na iniciação, desenvolvimento, reincidência do tumor e surgimento de metástases tumorais. As células estaminais cancerígenas demonstram ainda ter um papel importante na ineficácia das terapias convencionais contra o cancro (Liu *et al.*, 2017^a).

Foi demonstrado que as células cancerígenas têm a capacidade de se desenvolver de forma a escaparem à vigilância do sistema imune (Wang *et al.*, 2013). Assim, através de um fenómeno designado por imuno-edição, as células cancerígenas alteram a expressão do seu fenótipo de modo a serem menos imunogénicas. Pode, então, considerar-se que a expressão

elevada de CD47 é resultado da imuno-edição, levando à inibição da eliminação das células cancerígenas (Fig. 5) (Wang *et al.*, 2013).

Barrera e colaboradores (2017) demonstraram a possibilidade da expressão de CD47 ser o mecanismo utilizado pelas células de cancro do pulmão para escapar à fagocitose *in vitro* e *in vivo*. Através da análise comparativa entre tecido do cancro do pulmão e tecido lateral adjacente saudável percebeu-se que CD47 é sobre-expresso em células de cancro do pulmão, principalmente nas células estaminais (Barrera *et al.*, 2017). Foi ainda verificado que os níveis de expressão de CD47 se podiam correlacionar com a menor probabilidade de sobrevivência (Barrera *et al.*, 2017).

Anticorpos anti-CD47 inibem a capacidade de CD47 em transmitir o sinal aos macrófagos, permitindo a fagocitose de células cancerígenas, inclusive de células estaminais cancerígenas (McCracken *et al.*, 2015). No caso do tratamento do cancro do pulmão, verificou-se que a utilização de um anticorpo anti-CD47 era eficaz, tornando assim CD47 num potencial alvo terapêutico (Liu *et al.*, 2017^a). Este facto foi demonstrado com modelos de ratos que continham células de cancro do pulmão, verificando-se que a utilização de anticorpos anti-CD47 levou à inibição do crescimento tumoral e melhorou a sobrevivência dos animais portadores do tumor (Liu *et al.*, 2017^a). Os mesmos investigadores testaram se o anticorpo anti-CD47 poderia levar ao aumento de macrófagos nos tecidos tumorais. Os resultados revelaram que em tecidos tumorais o número de macrófagos foi superior comparativamente com os tecidos em que não foi adicionado anticorpo. Assim, assume-se que os anticorpos anti-CD47 podem recrutar macrófagos para o microambiente tumoral. Este recrutamento permite bloquear a capacidade de CD47 em transmitir o sinal aos macrófagos, permitindo a inibição do crescimento de células cancerígenas e a eliminação de células estaminais cancerígenas (Liu *et al.*, 2017^a).

Adicionalmente, Wang e colaboradores (2013) verificaram que a sobre-expressão de CD47 em isolados de melanoma humano era um mecanismo de defesa contra a fagocitose pelos macrófagos. Verificou-se também que amostras clínicas de melanoma apresentam expressão mais elevada de CD47 comparativamente com o nível em melanócitos e que essa expressão é semelhante à de células leucémicas, de linfoma e outras células cancerígenas (Wang *et al.*, 2013).

Um outro exemplo em que se verifica sobre-expressão de CD47 é o caso das células cancerígenas de leucemia mieloide aguda (Majeti *et al.*, 2009). Esta é uma neoplasia maligna sustentada por um subconjunto de células estaminais autorrenováveis (Estey and Dohner,

2006). Foi observado que o aumento da expressão de CD47 contribui para a patogenicidade desta doença, através da inibição da fagocitose pela interação de CD47 com o recetor SIRP α em fagócitos (Majeti *et al.*, 2009). Assim, o aumento da expressão de CD47 na leucemia mieloide humana está associado à diminuição da sobrevivência global. Ainda foi demonstrado que a utilização de anticorpos monoclonais direcionados contra CD47 interrompe a interação CD47/SIRP α , permitindo a fagocitose das células cancerígenas, tornando-se assim um possível novo método terapêutico no tratamento de cancro (Majeti *et al.*, 2009).

Para além das neoplasias referidas, existem também evidências de que a proteína CD47 é indicativa de prognóstico adverso do cancro do ovário (Liu *et al.*, 2017^b). Este é normalmente assintomático nas fases precoces da doença, podendo facilmente progredir e criar metástases. A grande maioria dos doentes é diagnosticada apenas quando a doença se torna sintomática, ou seja, num estágio mais tardio. Esta neoplasia propaga-se frequentemente por implantação das células cancerígenas na cavidade peritoneal (Huang *et al.*, 2014). Apesar de existir uma abundante quantidade de macrófagos nesta cavidade, as células cancerígenas conseguem escapar à resposta do sistema imunitário mediada por macrófagos devido à elevada expressão de CD47 nas células cancerígenas (Huang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017^b). Assim, CD47 promove a progressão do cancro de ovário por inibir a fagocitose das células cancerígenas pelos macrófagos. A utilização de um anticorpo monoclonal anti-CD47 inibe a ação desta proteína e, conseqüentemente, pode reverter esse efeito (McCracken *et al.*, 2015).

A angiogénese é um processo essencial para que uma lesão local de um tumor progrida para uma doença invasiva e metastática. O fator de crescimento endotelial vascular é um dos principais promotores da angiogénese através da ligação a recetores de tirosina cinase (Gao *et al.*, 2017).

A glicoproteína trombospondina-I foi o primeiro inibidor angiogénico natural a ser descoberto (Laklai *et al.*, 2009). Esta atua indiretamente afetando a biodisponibilidade de fatores angiogénicos, incluindo o fator de crescimento endotelial vascular, na matriz extracelular, subsequentemente inibindo a migração de células endoteliais ou induzindo apoptose (Laklai *et al.*, 2009). O fator de crescimento endotelial vascular promove a angiogénese através de diversos mecanismos, nomeadamente facilitando a invasão, migração e proliferação de células endoteliais (Gao *et al.*, 2017).

Foi demonstrado que a trombospondina-I sequestra o fator de crescimento do endotélio vascular segregado por células tumorais (Rogers *et al.*, 2014). Rogers e

colaboradores (2014) sugeriram ainda que o recetor do fator de crescimento endotelial vascular está associado a CD47 na superfície celular. A trombospondina-I ao ligar-se a CD47 altera esta interação inibindo a fosforilação do recetor do fator de crescimento endotelial vascular e, conseqüentemente, limitando a angiogénese (Rogers *et al.*, 2014). Assim, a regulação negativa da expressão da trombospondina-I representa um evento comum que caracteriza a mudança de vários tumores latentes para tumores angiogénicos de crescimento rápido, dando relevância ao papel crítico desta proteína na progressão do tumor (Laklai *et al.*, 2009).

Estas evidências demonstram que a utilização de anticorpos anti-CD47 pode ser controversa, uma vez que para além de induzir a resposta imunitária antitumoral por bloquear a interação entre CD47 de células tumorais e SIRP α de macrófagos, também interrompe a sinalização de CD47/trombospondina-I em células tumorais, o que pode facilitar a progressão do tumor (Gao *et al.*, 2017).

CD47 E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

As artérias são as principais condutoras do fluxo sanguíneo para os tecidos periféricos. Estas alteram dinamicamente o seu diâmetro, através de contrações e dilatações, com o objetivo de regular o fluxo sanguíneo, em resposta às alterações das necessidades metabólicas dos tecidos (Isenberg *et al.*, 2008^a). Por vezes, em resposta a fatores de risco cardiovascular, nomeadamente elevados níveis de colesterol, as células musculares lisas existentes nas artérias alteram o seu normal comportamento e acumulam-se nas paredes das artérias. Assim, ocorre um estreitamento dos vasos com conseqüente diminuição da perfusão dos tecidos e dando origem a um grupo de patologias que se designam doenças cardiovasculares (Isenberg *et al.*, 2008^a). Estas continuam a ser a principal causa de morbilidade e mortalidade no mundo ocidental, afetando mais de 80% das pessoas de uma faixa etária superior a 65 anos (Isenberg *et al.*, 2008^a; Rogers *et al.*, 2014).

O NO é um dos vasodilatadores locais que tem um papel crítico na saúde cardiovascular, uma vez que é responsável pelo relaxamento dos vasos sanguíneos (Roberts *et al.*, 2012). O endotélio é a primeira fonte de NO nos vasos sanguíneos (Roberts *et al.*, 2012). O NO é produzido no endotélio pela conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina catalisada pela enzima sintase de NO endotelial dependente de NADPH, que requer vários cofatores, incluindo Ca²⁺/calmodulina, dinucleótido de adenina flavina,

mononucleótido de flavina, e a tetra-hidrobiopterina (BH₄) (Bauer *et al.*, 2010). A sintase de NO é ativada por estímulos químicos e físicos, de forma a haver produção e libertação de NO pelas células endoteliais (Fig. 6) (Isenberg *et al.*, 2008^a).

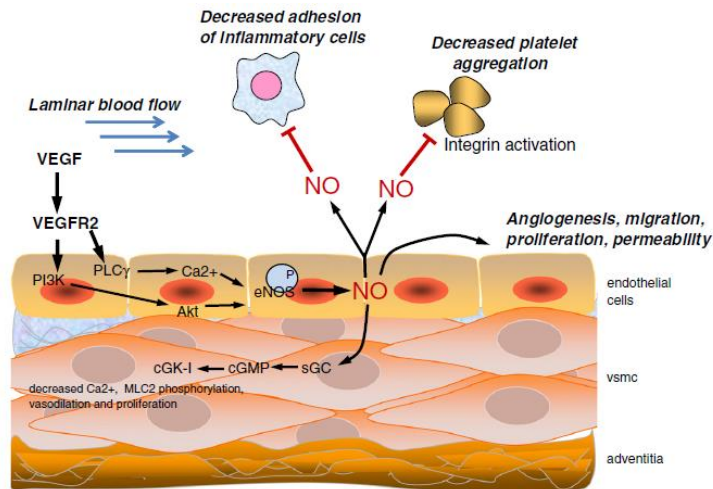


Fig. 6 – A sinalização de NO em artérias. O fluxo sanguíneo laminar e várias hormonas, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), estimulam a sintase de NO endotelial (eNOS) a produzir NO. VEGF origina a fosforilação de PLC γ (fosfolipase C gama), originando o aumento do Ca²⁺ intracelular e, conseqüentemente estimula a eNOS. VEGF, através do seu recetor (VEGFR2) leva também à ativação de eNOS via sinalização PI3K/Akt (PI3K- fosfatidilinositol-3-cinase, Akt- uma proteína cinase específica de serina/treonina) o que leva ao aumento da formação de NO. O NO rapidamente atravessa a membrana celular e ativa a guanilato ciclase solúvel (sGC), estimulando a produção de GMPc. Este último, vai dar origem a uma cascata de acontecimentos, cujo resultado final é a diminuição de cálcio livre e a desfosforilação da cadeia leve de miosina 2 (MLC2) com o resultante relaxamento das células de músculo liso vascular (vsmc). NO diminui também a adesão de células inflamatórias à membrana da célula. No lúmen arterial, NO diminui a produção de citocinas inflamatórias e a agregação plaquetar (adaptado de Rogers *et al.*, 2014).

O NO liga-se de forma covalente a resíduos de cisteína e tirosina de diferentes proteínas intracelulares, modificando a sua estrutura e função (Rogers *et al.*, 2014). Uma vez produzido, NO difunde-se através das membranas até às células musculares lisas vasculares, ocorrendo interação com a fração heme da guanilato ciclase solúvel (Fig. 6). Assim, aumenta a sua atividade enzimática, desfosforilando a guanosina trifosfato em GMPc, havendo acumulação de GMPc intracelular (Fig. 6) (Isenberg *et al.*, 2008^a). O GMPc, por sua vez, ativa a proteína cinase dependente de GMPc, a qual ativa a fosfatase da cadeia leve de miosina, iniciando o relaxamento do músculo liso por permitir a desfosforilação da cadeia leve de miosina (Fig. 6) (Roberts *et al.*, 2012).

O cálcio existente no músculo vascular liso estimula a cinase de cadeia leve de miosina, causando a fosforilação de miosina e, conseqüente vasoconstrição. Assim, outro

mecanismo pelo qual o GMPc leva ao relaxamento muscular está relacionado com a inibição da entrada de cálcio nas células e com a resultante diminuição de cálcio intracelular. O aumento de GMPc origina ainda a ativação dos canais de potássio promovendo a hiperpolarização do músculo liso, levando assim ao seu relaxamento (Ramanathan *et al.*, 2011).

Desta forma, NO induz o relaxamento destas células, dilata os vasos sanguíneos e melhora a perfusão tecidual (Isenberg *et al.*, 2008^a). A difusão de NO para o lúmen dos vasos diminui a ativação da integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, inibe a agregação plaquetar e a adesão de células inflamatórias às paredes dos vasos (Fig. 6). Em adição a este efeito inibitório da inflamação, estudos *in vitro* demonstraram o papel anti-aterogénico do NO (Rogers *et al.*, 2014).

A perda de sinalização de NO em células vasculares e vasos sanguíneos é um acontecimento comum e contribui para o aparecimento de doenças cardiovasculares (Rogers *et al.*, 2014).

A trombospondina-I é uma proteína da matriz celular como referido, regulada positivamente nas células vasculares após lesão e em doenças crónicas (Bauer *et al.*, 2010). Existem evidências de que a trombospondina-I exerce um papel fundamental no controlo de respostas vasculares, através da interação com o recetor de elevada afinidade, CD47 (Rogers *et al.*, 2014). Observou-se que a sinalização da trombospondina-I através de CD47 leva ao aumento dos níveis de cálcio citoplasmáticos o que impede a ativação da guanilato ciclase solúvel (Roberts *et al.*, 2012). Assim, não havendo ativação da guanilato ciclase solúvel, não há formação de GMPc e, por conseguinte, não ocorre a sinalização de NO/GMPc (Rogers *et al.*, 2014). Para além desta ação inibitória na sinalização de NO, existem evidências de que a trombospondina-I inibe a produção de NO mediada pela sintase de NO endotelial (Bauer *et al.*, 2010). Assim, verifica-se uma inibição dos efeitos fisiológicos de NO (Bauer *et al.*, 2010). Deste modo, há diminuição do relaxamento dos vasos sanguíneos, limitando o fluxo sanguíneo e, conseqüente, diminuição da perfusão dos tecidos, promovendo doenças a nível vascular (Bauer *et al.*, 2010).

Pode-se assim afirmar que elevados níveis da trombospondina-I estão correlacionados positivamente com doenças cardiovasculares, sugerindo que esta proteína é potenciadora de disfunção vascular. A utilização de anticorpos anti-trombospondina-I ou anti-CD47 pode ser uma alternativa terapêutica, de forma a interromper a interação CD47/trombospondina-I e os conseqüentes efeitos fisiológicos (Roberts *et al.*, 2012).

CD47 E ATEROSCLEROSE

A aterosclerose é uma doença inflamatória crónica da parede das artérias (Buttari et al., 2015). Apesar de haver um notável progresso na prevenção, diagnóstico e tratamento, esta patologia continua a ser a causa principal de mortalidade em todo o mundo (Slee et al., 2016). É uma doença multifatorial em que estão implicados vários fatores de risco como hiperlipidémia, hipertensão, diabetes, obesidades e histórico familiar de doenças cardiovasculares. Muitos destes fatores promovem mecanismos de inflamação e stress oxidativo, favorecendo a aterosclerose que se inicia com a resposta inflamatória da parede vascular a um dano, através da ativação do sistema imune (Buttari et al., 2015).

Durante muitos anos acreditou-se que a aterosclerose surgia apenas por acumulação de colesterol na parede dos vasos. Hoje, sabe-se que o processo de formação desta patologia é muito mais complexo, ou seja, também o sistema imunológico, com elementos da resposta inata e adaptativa, contribui para o desenvolvimento de placas ateroscleróticas. A ativação do sistema imune dá origem a um baixo nível de inflamação, através da secreção de citocinas pro-inflamatórias pelos leucócitos, o qual pode levar ao lento desenvolvimento da doença aterosclerótica (Hansson and Hermansson, 2011; Buttari et al., 2015).

A placa aterosclerótica é caracterizada por uma acumulação de lípidos na parede das artérias, juntamente com a infiltração de células do sistema imune, tais como macrófagos, células T e mastócitos. Outra característica desta patologia é o facto de as células musculares lisas formarem uma cápsula fibrosa, composta principalmente por colagénio (Hansson and Hermansson, 2011). No início da patologia há a existência de lesões precoces que consistem na deposição de lípidos subendoteliais e na formação de células esponjosas através da acumulação de lípidos em macrófagos. Ao longo do tempo, desenvolve-se uma lesão mais complexa, sendo que o crescimento da placa pode causar estenose (estreitamento do lúmen da artéria) que pode contribuir para a isquémia do tecido circundante (Hansson and Hermansson, 2011). A rutura da placa provoca trombose, bloqueando o fluxo sanguíneo na artéria, resultando em eventos cardiovasculares derivados de isquémia aguda (Linton et al., 2016).

Kojima e colaboradores (2016) demonstraram que o processo de aterogénese anteriormente referido está associado com uma regulação positiva de CD47. Efetuaram ensaios em que utilizaram as técnicas de imunofluorescência e coloração imuno-histoquímica de artérias coronárias e carótidas humanas, as quais confirmaram que, gradualmente, CD47

é regulada positivamente durante a aterosclerose e parece estar intensivamente localizada no núcleo necrótico (Kojima *et al.*, 2016). Este aumento de CD47 parece estar relacionado com uma citocina pro-inflamatória que está regulada positivamente na aterosclerose, desencadeando o aumento da expressão de CD47. Essa citocina designa-se de fator de necrose tumoral (TNF) e foi demonstrado que CD47 é regulada positivamente por TNF ao atuar no recetor de TNF tipo I (Fig. 7) (Faruqi, 2016). Desta forma, é necessário esclarecer o mecanismo pelo qual a proteína CD47 é potenciadora do processo de aterogénese.

O corpo humano regenera diariamente 100 biliões de células. A remoção rápida e eficiente das células com danos ou envelhecidas é essencial para manter a homeostase dos tecidos. Estas são rapidamente eliminadas através de um processo fagocítico conhecido como regeneração celular programada ou eferocitose (Kavurma *et al.*, 2017). Este é mediado por macrófagos que detetam sinais na superfície das células, pelo que pode ser contrariado por sinais anti-fagocíticos, como a expressão de CD47 (Linton *et al.*, 2016).

Apesar da eferocitose ser um processo que se mantém preservado na quase globalidade das condições fisiológicas e em todos os tecidos, encontra-se diminuído na aterosclerose, levando à acumulação de células vasculares danificadas no interior dos vasos sanguíneos (Faruqi, 2016). Observou-se que a regulação positiva de CD47 está na origem dessa diminuição, o que ao longo do tempo pode promover a expansão da lesão (Linton *et al.*, 2016). O mecanismo pelo qual a fagocitose está diminuída na placa aterosclerótica humana está relacionado com a ligação de CD47 a SIRP α (Fig. 7). A ativação deste recetor, frequentemente resulta na fosforilação de SHP-I, levando ao bloqueio da fagocitose (Fig. 7) (Kojima *et al.*, 2016).

Como referido anteriormente, a eferocitose é um processo crítico para a formação da placa aterosclerótica. Deste modo, é necessário que existam terapêuticas que restabeleçam a eficiência da eferocitose (Linton *et al.*, 2016). Uma possível alternativa terapêutica é a administração de anticorpos bloqueadores de CD47 que inibam a interação CD47-SIRP α originando uma diminuição na fosforilação de SHP-I na placa aterogénica (Fig. 7). Assim, a terapia anti-CD47 pode reduzir a aterosclerose pois há reativação da eferocitose, normalizando a eliminação de tecido vascular danificado (Fig. 7) (Linton *et al.*, 2016). Observou-se ainda que a terapêutica com anticorpos anti-CD47 quando combinada com anticorpos anti-TNF era significativamente melhorada, possivelmente devido à maior inibição da expressão de CD47 (Faruqi, 2016; Linton *et al.*, 2016).

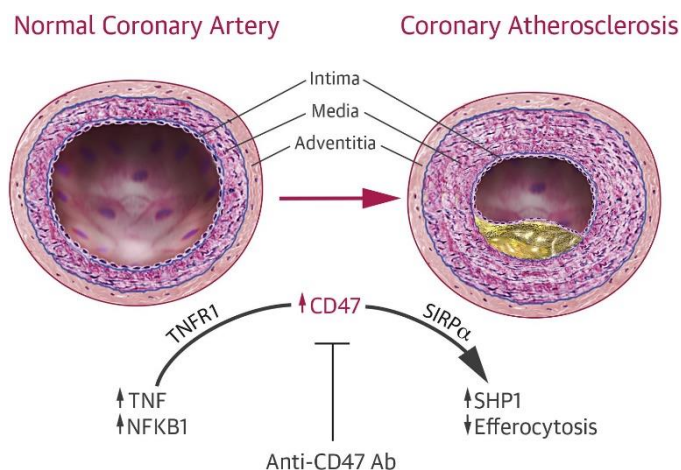


Fig. 7 – O papel de CD47 e TNF (fator de necrose tumoral) no desenvolvimento da aterosclerose. TNF é uma citocina pro-inflamatória que está regulada positivamente na aterosclerose, desencadeando o aumento da expressão de CD47. O fator pro-inflamatório NFKB1 (Fator nuclear kappa B1) foi correlacionado positivamente com a expressão de CD47. A interação CD47/SIRP α leva à ativação de SHP-I, havendo diminuição da eferocitose. O tratamento com anticorpos anti-CD47 está relacionado com uma redução considerável da aterosclerose (adaptado de Kojima *et al.*, 2016; Ryan, 2016).

CD47 COMO ALVO TERAPÊUTICO

Diferentes alternativas terapêuticas, tendo em conta a interação CD47/SIRP α , estão a ser alvo de investigação pré-clínica e clínica, nomeadamente a administração de anticorpos anti-CD47, a utilização de siRNA e de polipeptídeos recombinantes (Fig. 8) (Weiskopf, 2017). No caso dos anticorpos anti-CD47, estes demonstraram ter eficácia na inibição do crescimento de tumores *in vitro* e *in vivo*. Como CD47 é sobre-expressa em várias neoplasias, o seu bloqueio pode ser uma alternativa terapêutica a ter em consideração nesta patologia. No entanto, para além da sua sob-expressão em células cancerígenas, CD47 também é expresso a diferentes níveis em células não tumorais, tendo por isso de se ter em conta a toxicidade inerente ao uso destes anticorpos (Liu *et al.*, 2017^a). A administração de anticorpos anti-CD47 impede o crescimento do tumor e previne a ocorrência de metástases, uma vez que a interação CD47/SIRP α é bloqueada e, conseqüentemente, as células tumorais são fagocitadas. Embora esta terapia tenha demonstrado ser eficaz, levantaram-se algumas preocupações quanto à sua segurança, devido à expressão ubíqua de CD47, nomeadamente nas células hematopoiéticas (Wang *et al.*, 2013). Por exemplo, ratos que foram administrados com este tipo de anticorpos apresentaram sinais de anemia e neutropenia (Majeti *et al.*, 2009).

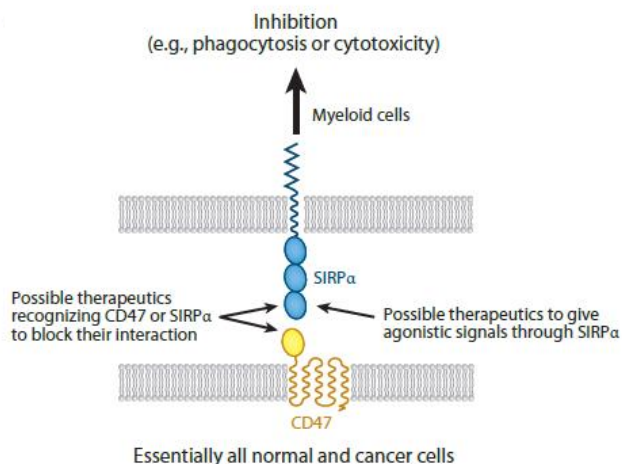


Fig. 8 – Possíveis alvos terapêuticos da interação CD47-SIRP α . Tanto SIRP α como CD47 são possíveis alvos terapêuticos em que os anticorpos ou outros reagentes reagem com o local de interação CD47/SIRP α e neutralizam os sinais inibitórios subsequentes (adaptado de Barclay and Berg, 2014).

De forma a evitar estes efeitos indesejáveis, Wang e colaboradores (2013) testaram uma terapia utilizando siRNA, através da formulação de siRNA em nanopartículas, tendo como alvo CD47. Utilizaram células cancerígenas de melanoma, testando uma alternativa terapêutica baseada no silenciamento de CD47 com siRNA de forma a inibir a progressão do melanoma e possíveis metástases (Wang *et al.*, 2013). O siRNA anti-CD47 foi encapsulado em nanopartículas, de modo a ser libertado continuamente e especificamente no melanoma. Assim, demonstrou-se ser possível bloquear o sinal inibitório da fagocitose nas células cancerígenas, resultando numa inibição significativa do crescimento de tumor sólido e da disseminação de metástases (Wang *et al.*, 2013).

Adicionalmente, Liu e colaboradores (2017^a) demonstraram que não havia efeitos tóxicos significativos decorrentes da utilização de anticorpos anti-CD47, à exceção de anemia temporária e redução de leucócitos. As evidências deste estudo sugerem que estes anticorpos não conseguem induzir a fagocitose de células hospedeiras *in vitro*. Assim, apesar de não haver a sinalização CD47/SIRP α , as células saudáveis não sofrem fagocitose pelos fagócitos por falta de uma sinalização secundária pró-fagocítica (Liu *et al.*, 2017^a).

Para além das terapêuticas com anticorpos monoclonais e a formulação de siRNA, estão também a ser desenvolvidos polipeptídeos recombinantes derivados de SIRP α como reagentes bloqueadores da interação SIRP α . Estes atuam como recetores que ligam a CD47 e competem com SIRP α nas células imunes (Weiskopf, 2017).

No caso do tratamento de patologias vasculares deve ter-se em conta a melhoria do fluxo sanguíneo e da perfusão dos tecidos. Isenberg e colaboradores (2008^a) testaram diferentes abordagens para bloquear a sinalização CD47/trombospondina-I, utilizando anticorpos anti-CD47 ou anti-trombospondina-I. Estes anticorpos bloqueiam a capacidade da trombospondina-I em inibir a acumulação de GMPc estimulada pelo NO, permitindo o relaxamento dos vasos, com aumento do fluxo sanguíneo e da perfusão tecidual (Roberts et al., 2012).

Desta forma, pode considerar-se que a aplicação de uma terapêutica visando a sinalização de CD47/trombospondina-I pode ter efeitos benéficos no tratamento de patologias vasculares, dado o importante papel de NO no controlo do tónus vascular e da função cardíaca (Isenberg et al., 2008^a).

CONCLUSÃO

A escolha deste tema surgiu na sequência do estágio em farmácia comunitária. Assim, optei por desenvolver os meus conhecimentos acerca da proteína CD47, que é um fator comum a diferentes patologias, nomeadamente cancro, doenças cardiovasculares e aterosclerose, que representam uma importante causa de mortalidade e morbilidade em todo o mundo.

A proteína CD47 apresenta diferentes interações consoante a patologia, desencadeando uma série de eventos fisiológicos que levam, na maioria das situações, ao agravamento da doença.

Dada a ação desta molécula, foi demonstrado que a utilização de anticorpos anti-CD47 bloqueia os efeitos fisiológicos desta proteína. Foi referido que a utilização desses anticorpos diminuiu a progressão de neoplasias e o aparecimento de metástases. No entanto, foram descritos alguns casos de toxicidade ligeira, nomeadamente o aparecimento de anemia temporária. No caso das doenças cardiovasculares e aterosclerose, a utilização de anticorpos inibidores da interação CD47/trombospondina-I exibiu notórias melhorias da função cardíaca.

Em conclusão, considero que o farmacêutico comunitário, dada a sua posição privilegiada no seio da população, tem um papel fundamental em alertar os utentes para a prevenção de patologias como as doenças cardiovasculares, entre as quais a aterosclerose. Embora esteja em investigação uma nova alternativa terapêutica que poderá ter uma ação crucial no tratamento destas patologias, esta não é totalmente inócua, pelo que deve optar-se pela prevenção destas doenças. Assim, é fundamental que o farmacêutico comunitário advirta os utentes para um estilo de vida saudável, adotando uma alimentação equilibrada e a prática regular de exercício físico.

BIBLIOGRAFIA

- Barclay NA, Berg TK. The Interaction Between Signal Regulatory Protein Alpha (SIRP α) and CD47: Structure, Function, and Therapeutic Target. *Annu Rev Immunol* 32, 25–50, 2014.
- Barrera L, Montes-Servin E, Hernandez-Martinez JM, García-Vicente MLÁ, Montes-Servin E, Herrera-Martínez M, Crispín JC, Borbolla-Escoboza JR, Arrieta O. CD47 overexpression is associated with decreased neutrophil apoptosis/phagocytosis and poor prognosis in non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 117, 385–397, 2017.
- Bauer EM, Qin Y, Miller TW, Bandle RW, Csanyi G, Pagano PJ, Bauer PM, Schnermann J, Roberts DD, Isenberg JS. Thrombospondin-1 supports blood pressure by limiting eNOS activation and endothelial-dependent vasorelaxation. *Cardiovasc Res* 88, 471–481, 2010.
- Brooke G, Holbrook JD, Brown MH, Barclay AN. Human lymphocytes interact directly with CD47 through a novel member of the signal regulatory protein (SIRP) family. *J Immunol* 173, 2562–2570, 2004.
- Buttari B, Profumo E, Riganò R. Crosstalk between Red Blood Cells and the Immune System and Its Impact on Atherosclerosis. *Biomed Res Int* 2015, 1–8, 2015.
- Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 368, 1894–1907, 2006.
- Faruqi M. Cardiovascular disease: Reactivating cellular rubbish removal ameliorates atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 15, 602–3, 2016.
- Gao L, Chen K, Gao Q, Wang X, Sun J, Yang YG. CD47 deficiency in tumor stroma promotes tumor progression by enhancing angiogenesis. *Oncotarget* 8, 22406–22413, 2017.
- Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 12, 204–212, 2011.
- Huang Y, Zhao M, Xu H, Wang K, Fu Z, Jiang Y, Yao Z. RASAL2 down-regulation in ovarian cancer promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis. *Oncotarget* 5, 6734–6745, 2014.
- Isenberg JS, Frazier WA, Krishna MC, Wink DA, Roberts DD. Enhancing Cardiovascular Dynamics by Inhibition of Thrombospondin-1/CD47 Signaling. *Curr Drug Targets* 9, 833–841, 2008^a.

Isenberg JS, Roberts DD, Frazier WA. CD47 A New Target in Cardiovascular Therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 615–621, 2008^b.

Isenberg JS, Annis DS, Pendrak ML, Ptaszynska M, Frazier WA, Mosher DF, Roberts DD. Differential Interactions of Thrombospondin-1, -2, and -4 with CD47 and Effects on cGMP Signaling and Ischemic Injury Responses. *J Biol Chem* 284, 1116–1125, 2009^a.

Isenberg JS, Shiva S, Gladwin MT. Thrombospondin-1-CD47 blockade and exogenous nitrite enhance ischemic tissue survival, blood flow and angiogenesis via coupled NO-cGMP pathway activation. *Nitric Oxide* 21, 52–62, 2009^b.

Jaiswal S, Jamieson CH, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, Traver D, Rooijen NV, Weissman IL. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell* 138, 271–285, 2009.

Kavurma MM, Rayner KJ, Karunakaran D. The walking dead: macrophage inflammation and death in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 28, 91–98, 2017.

Kojima Y, Volkmer JP, McKenna K, Civelek M, Lusis AJ, Miller C, Direnzo D, Nanda V, Ye J, Connolly A, Schadt E, Quertermous T, Betancur P, Maegdefessel L, Perisic L, Hedin U, Weissman I, Leeper NJ. CD47 blocking antibodies restore phagocytosis and prevent atherosclerosis. *Nature* 536, 86–90, 2016.

Laklai H, Laval S, Dumartin L, Rochaix P, Hagedorn M, Bikfalvi A, Le Guellec S, Delisle MB, Schally AV, Susini C, Pyronnet S, Bousquet C. Thrombospondin-1 is a critical effector of oncosuppressive activity of sst2 somatostatin receptor on pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17769–17774, 2009.

Li SS, Ivanoff A, Bergstrom SE, Sandstrom A, Christensson B, van Nerven J, Holgersson J, Hauzenberger D, Arencibia I, Sundqvist KG. T lymphocyte expression of thrombospondin-1 and adhesion to extracellular matrix components. *Eur J Immunol* 32, 1069–1079, 2002.

Linton MF, Babaev VR, Huang J, Linton EF, Tao H, Yancey PG. Macrophage Apoptosis and Efferocytosis in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ J* 80, 2259–2268, 2016.

Liu L, Zhang L, Yang L, Li H, Li R, Yu J, Yang L, Wei F, Yan C, Sun Q, Zhao H, Yang F, Jin H, Wang J, Wang SE, Ren X. CD47 Antibody As a Targeted Agent for Lung Cancer and CSCs. *Front Immunol* 8, 1–17, 2017^a.

- Liu R, Wei H, Gao P, Yu H, Wang K, Fu Z, Ju B, Zhao M, Dong S, Li Z, He Y, Huang Y, Yao Z. CD47 promotes ovarian cancer progression by inhibiting macrophage phagocytosis. *Oncotarget* 8, 39021–39032, 2017^b.
- Liu X, Kwon H, Li Z, Fu Y. Is CD47 an innate immune checkpoint for tumor evasion? *J Hematol Oncol* 10, 1–10, 2017^c.
- Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, Pang WW, Jaiswal S, Gibbs KD, Rooijen NV, Weissman IL. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* 138, 286–299, 2009.
- Matozaki T, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H. Functions and molecular mechanisms of the CD47–SIRPalpha signalling pathway. *Trends Cell Biol* 19, 72–80, 2009.
- McCracken MN, Cha AC, Weissman IL. Molecular pathways: activating T cells after cancer cell phagocytosis from blockade of CD47 “don’t eat me” signals. *Clin Cancer Res* 21, 3597–601, 2015.
- Murata Y, Kotani T, Ohnishi H, Matozaki T. The CD47-SIRP α signalling system: its physiological roles and therapeutic application. *J Biochem* 155, 335–344, 2014.
- Okazawa H, Motegi S, Ohyama N, Ohnishi H, Tomizawa T, Kaneko Y, Oldenborg P, Ishikawa O, Matozaki T. Negative regulation of phagocytosis in macrophages by the CD47-SHPS-I system. *J Immunol* 174, 2004–2011, 2005.
- Oldenborg PA, Zheleznyak A, Fang YF, Lagenaur CF, Gresham HD, Lindberg FP. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 288, 2051–2054, 2000.
- Oldenborg PA. CD47: a cell surface glycoprotein which regulates multiple functions of hematopoietic cells in health and disease. *ISRN Hematol* 2013, 1–15, 2012.
- Ramanathan S, Mazzalupo S, Boitano S, Montfort WR. Thrombospondin-I and Angiotensin II Inhibit Soluble Guanylyl Cyclase through an Increase in Intracellular Calcium Concentration. *Biochemistry* 50, 7787–7799, 2011.
- Reinhold MI, Lindberg FP, Plas D, Reynolds S, Peters MG, Brown EJ. In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47). *J Cell Sci* 108, 3419–3425, 1995.

Roberts DD, Miller TW, Rogers NM, Yao M, Isenberg JS. The Matricellular Protein Thrombospondin-1 Globally Regulates Cardiovascular Function and Responses to Stress via CD47. *Matrix Biol* 31, 162–169, 2012.

Rogers NM, Sharifi-Sanjani M, Csányi G, Pagano PJ, Isenberg JS. Thrombospondin-1 and CD47 Regulation of Cardiac, Pulmonary and Vascular Responses in Health and Disease. *Matrix Biol* 37, 92–101, 2014.

Ryan JJ. CD47-Blocking Antibodies and Atherosclerosis. *JACC Basic Transl Sci* 1, 413–415, 2016.

Sick E, Jeanne A, Schneider C, Dedieu S, Takeda K, Martiny L. CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest. *Br J Pharmacol* 167, 1415–1430, 2012.

Slee JB, Alferieva IS, Nagaswamic C, Weiselc JW, Levya RJ, Fishbeina I, Stacheleka SJ. Enhanced biocompatibility of CD47-functionalized vascular stents. *Biomaterials* 87, 82–92, 2016.

Tsai RK, Discher DE. Inhibition of “self” engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells. *J Cell Biol* 180, 989–1003, 2008.

Takizawa H, Manz MG. Macrophage tolerance: CD47-SIRP-alpha-mediated signals matter. *Nat Immunol* 8, 1287–1289, 2007.

Wang Y, Xu Z, Guo S, Zhang L, Sharma A, Roberson GP. Intravenous Delivery of siRNA Targeting CD47 Effectively Inhibits Melanoma Tumor Growth and Lung Metastasis. *Mol Ther* 21, 1919–1929, 2013.

Weiskopf K. Cancer immunotherapy targeting the CD47/SIRP α axis. *Eur J Cancer* 76, 100–109, 2017.