

**O papel da epigenética e dos fatores ambientais
na patofisiologia da Atresia Biliar
Experiência Profissionalizante na vertente de
Farmácia Comunitária e Investigação**

Ana Rita Guimarães Pimentel Gama

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas
(Mestrado Integrado)

Orientador: Professor Doutor Jorge Luiz dos Santos
Co-orientador: Doutor Jorge Manuel Santos Marques Oliveira

Julho de 2021

Change your skin like a snake
until being the best version of yourself.

Agradecimentos

A realização desta dissertação e de todo o meu percurso académico só foram possíveis com o apoio, incentivo e contribuição de pessoas extraordinárias.

Ao Professor Doutor Jorge Santos, pela orientação, paciência, apoio, disponibilidade, dedicação, colaboração, preocupação, entusiasmo e calma contagiante.

Ao Doutor Jorge Oliveira, pela orientação, disponibilidade, colaboração, dedicação, zelo e preocupação.

À Professora Doutora Luiza Granadeiro, pela “porta sempre aberta”, pela paciência, conselhos e ajuda nos momentos difíceis.

À equipa da Farmácia São João, pelo carinho, ajuda, ensinamentos e amizade.

À Dra. Dina Esteves, pela orientação, exemplo de profissionalismo, carinho e ajuda.

Aos colegas de curso que ficam amigos para a vida, pelo carinho, ajuda, paciência para me impedir de desistir, de todas as vezes que disse que o faria.

Aos amigos de sempre, pelo apoio e confiança depositada mesmo a 300km de distância.

Ao meu Tiago, por acreditar em mim sempre que eu não acreditei e me levantar quando não o conseguia fazer.

Aos meus pais, pelo modelo de coragem e persistência, pelo apoio incondicional, carinho e paciência ao longo desta caminhada.

A todos, o meu mais sincero agradecimento.

Resumo

A presente dissertação descreve a minha experiência profissionalizante para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas em duas vertentes, sendo elas, Farmácia Comunitária e Investigação.

O Capítulo I descreve todo o trabalho de investigação desenvolvido. A Atresia Biliar é a causa mais frequente de colestase neonatal e o motivo principal para a realização de transplante hepático em crianças. A etiologia da Atresia Biliar permanece pouco esclarecida, podendo em alguns casos resultar de um conjunto de fatores em associação com a constituição genética e epigenética dos doentes. Tendo em conta o grande número de referências na literatura relativamente a fatores ambientais e epigenéticos associados à patofisiologia, poderá realmente existir uma relação causa-efeito? Este trabalho teve por objetivo, através da revisão sistemática da literatura, integrar a informação disponível nos estudos científicos sobre o papel dos fatores epigenéticos e ambientais na patofisiologia da Atresia Biliar e eventualmente, fatores epigenéticos ambientais mais preponderantes e descritos para a patofisiologia e aparecimento da patologia em recém-nascidos. Apesar de já existir alguma investigação em epigenética, a maioria é realizada em modelos animais, sendo necessários realizar mais estudos para identificar os fatores e as suas vias de atuação na patologia. No entanto, apesar da patofisiologia da Atresia Biliar ser complexa e repleta de nuances, os fatores epigenéticos (microRNAs e metilação do DNA) e ambientais (toxinas e hipoxia) assumem um papel importante, não apenas da patogénese, mas também no diagnóstico precoce da doença.

O Capítulo II é preenchido pelo Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária, onde é descrita a experiência de estágio na Farmácia São João, na Covilhã, e todos os conhecimentos obtidos através desta experiência. São então referidas todas as características e particularidades inerentes ao trabalho diário de um Farmacêutico Comunitário.

Palavras-chave

Colestase neonatal; Atresia Biliar; genética; epigenética; fatores epigenéticos; Farmácia Comunitária.

Abstract

This dissertation describes my professional experience to obtain a Master's degree in Pharmaceutical Sciences through two fields: Community Pharmacy and Research.

Chapter I describes all the developed research. Biliary Atresia is the most frequent cause of neonatal cholestasis and the main reason for liver transplantation in children. The etiology of Biliary Atresia remains unknown and may represent a set of factors in association with the genetic and epigenetic constitution of patients. Considering a large number of references in the literature to environmental and epigenetic factors associated with pathophysiology, could there be a cause-effect relationship? This work aimed, through a systematic literature review, to integrate the information available in scientific studies on the role of epigenetic and environmental factors in the pathophysiology of Biliary Atresia and, eventually, more prevalent and described environmental epigenetic factors for the pathophysiology and appearance of the pathology in newborns. Although some investigation concerning epigenetics in Biliary Atresia have been reported, most were carried out in animal models, and further studies are needed to understand the factors and pathways acting in the pathology. Despite its pathophysiology of Biliary Atresia is complex and full of nuances, epigenetic (microRNAs and DNA methylation) and environmental (toxins and hypoxia) factors play an important role in Biliary Atresia, not only in its pathogenesis but also in the early diagnosis of the disease.

Chapter II contains the Community Pharmacy Internship Report, which describes the internship experience at the São João Pharmacy, in Covilhã, and all the knowledge obtained through this experience. It reported the characteristics and particularities of the pharmacy and the daily work of a Community Pharmacist.

Keywords

Neonatal cholestasis; Biliary atresia; genetics; epigenetics; epigenetic factors; Community Pharmacy.

Índice

Capítulo 1	1
1. Introdução	1
1.1. Anatomia e fisiologia do fígado e vias biliares	2
1.2. Anatomia do sistema biliar	8
1.3. Funções do fígado	9
1.3.1. Produção, armazenamento e secreção de bÍlis	12
1.4. Colestase Neonatal	13
1.5. Fisiopatologia das variantes patológicas de colestase neonatal	15
1.6. Atresia Biliar	17
1.7. Epigenética	20
1.7.1. Mecanismos epigenéticos	21
1.7.2. A influência epigenética no fígado	23
1.8. Objetivo	24
2. Metodologia	24
3. RNAs não codificantes	25
3.1. MicroRNAs	25
3.1.1. MiR-30	26
3.1.2. MiR-29	26
3.1.3. MiR-let7a-5p	27
3.1.4. MiR-4429 e miR-4689	28
3.1.5. MiR-200b/429	28
3.1.6. MiR-21	29
3.1.7. MiR-145	30
3.1.8. MiR-140-3p	30
3.1.9. Outros microRNAs	31
3.2. RNA não codificante longo	32
4. Stress Oxidativo	33
4.1. Toxinas	33
4.1.1. Biliatresona	33
4.1.2. Estrogénios	35

4.2.	Hipóxia	37
5.	Metilação do DNA	40
5.1.	Autotaxina	41
6.	Complexidade da patofisiologia da Atresia Biliar - Suscetibilidade genética, fatores ambientais e outros achados	43
	Referências bibliográficas	47
	Capítulo 2	55
1.	Introdução	55
2.	Grupo Holon	56
3.	A Farmácia São João	56
3.1.	Localização e Horário	56
3.2.	Espaço exterior	57
3.3.	Espaço interior	57
3.3.1.	Área de atendimento ao público	58
3.3.2.	Áreas de receção de encomendas e armazenamento primário	59
3.3.3.	Gabinete de atendimento personalizado	60
3.3.4.	Piso inferior da FSJ	60
3.3.5.	Equipamentos	60
3.4.	Recursos Humanos	61
3.5.	Sistemas informáticos	62
4.	Informação e Documentação Científica	62
5.	Medicamentos e outros produtos de saúde	63
6.	Aprovisionamento e Armazenamento	66
6.1.	Fornecedores e encomendas	66
6.2.	Receção e verificação de encomendas	68
6.3.	Devoluções	69
6.4.	Marcação de preços e margens legais de comercialização	70
6.5.	Gestão de prazos de validade	71
6.6.	Controlo de temperatura e humidade	71
6.7.	Armazenamento	71

7.	Interação farmacêutico-utente-medicamento	72
7.1.	Farmacovigilância	74
7.2.	Medicamentos fora de uso - VALORMED	74
8.	Dispensa de medicamentos	75
8.1.	Dispensa de Medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM)	76
8.2.	Regimes de comparticipação	78
8.3.	Medicamentos estupefacientes e psicotrópicos	78
8.4.	Dispensa de proximidade de medicamentos hospitalares	79
9.	Automedicação	79
10.	Aconselhamento e dispensa de outros produtos de saúde	80
10.1.	Produtos de dermofarmácia, cosmética e higiene	80
10.2.	Produtos dietéticos para alimentação especial	81
10.3.	Produtos dietéticos infantis	82
10.4.	Fitoterapia e suplementos nutricionais	82
10.5.	Medicamentos de uso veterinário	83
10.6.	Dispositivos médicos	83
11.	Outros cuidados de saúde prestados	84
11.1.	Serviço de Check Saúde	85
11.2.	Serviço de administração de vacinas e injetáveis	85
11.3.	Serviço de pé diabético	85
11.4.	Projetos na comunidade	86
12.	Preparação de medicamentos	86
12.1.	Medicamentos Manipulados	86
12.2.	Preparações extemporâneas	88
13.	Receituário e faturação	88
14.	Considerações finais	89
	Referências bibliográficas	90

Lista de Figuras

Figura 1. Anatomia da superfície diafragmática do fígado. _____	3
Figura 2. Anatomia da superfície visceral do fígado. _____	3
Figura 3. Representação esquemática da anatomia funcional do fígado. _____	5
Figura 4. Esquema ilustrativo dos modelos de organização estrutural e funcional do fígado. _____	6
Figura 5. Lóbulos hepáticos. _____	7
Figura 6. Estrutura celular do fígado. _____	8
Figura 7. Vesícula biliar e trato biliar. _____	9
Figura 8. Secreção hepática e esvaziamento biliar. _____	13
Figura 9. Escala cromática das fezes, com demonstração de fezes normais e fezes suspeitas, em relação à possibilidade de Colestase Neonatal. _____	15
Figura 10. Mecanismos epigenéticos. _____	22
Figura 11. Estrutura química da biliatresona. _____	34

Lista de Tabelas

Tabela 1. Modelos propostos para a estrutura funcional do fígado. _____	6
Tabela 2. Causas de Colestase Neonatal. _____	16
Tabela 3. Formas de Atresia Biliar de acordo com a localização anatômica da obstrução mecânica extra-hepática. _____	18
Tabela 4. MicroRNAs referidos em menor extensão na literatura. _____	31

Lista de Acrónimos

AIM	Autorização de Introdução no Mercado
ANF	Associação Nacional das Farmácias
AT	Autoridade Tributária
ATX	Autotaxina
AVB	Atresia Biliar
BASM	Síndrome de Malformação Espelénica
BD	Bilirrubina Direta
BDL	Ligação do Ducto Biliar
BPF	Boas Práticas Farmacêuticas
BRIC	Colestase Intra-hepática Recorrente Benigna
CCF	Centro de Conferência de Faturas
CHUC	Centro Hospitalar Universitário de Coimbra
CMV	Citomegalovírus
CNP	Código Nacional do Produto
CNPEM	Código nacional de prescrição eletrónica do medicamento
CpG	Ilha CpG
DGAV	Direção Geral de Alimentação e Veterinária
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNMT's	DNA metiltransferases
DSG	Doenças de Armazenamento de Glicogénio
ECM	Deposição de matriz extracelular
EHCs	Colangiócitos extra-hepáticos
EMA	Agência Europeia do Medicamento
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
ER	Recetor de estrogénio
ESPGHAN	Sociedade Europeia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição
FD	Farmácia Diamantino
FEFO	<i>(First Expire – First Out)</i>
FGP	Formulário Galénico Português
FIFO	<i>(First In- First Out)</i>
FP	Farmacopeia Portuguesa
FSJ	Farmácia São João
GGT	Gamaglutamiltransferase
GSH	Glutathiona
HH	Via Hedgehog

HIFs	Fatores induzíveis por hipóxia
HP	Hipertensão Portal
HPC	Células Progenitoras Hepáticas
HSCs	Células estreladas hepáticas
IHCs	Colangiócitos intra-hepáticos
IMC	Índice de Massa Corporal
INF- γ	Interferão Gama
IVA	Imposto de valor acrescentado
lncRNAs	RNAs não codificantes longos
LPA	Ácido lisofosfatídico
MAPK	Vias da proteína quinase ativada por mitogénio
MBD	Proteínas conservadas com domínio de ligação ao DNA
MEP	Medicamentos estupefacientes e psicotrópicos
miRNAs	MicroRNAs
MNSRM	Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica
MNSRM-EF	Medicamentos não sujeitos a receita médica de dispensa exclusiva em farmácia
MSRM	Medicamentos Sujeitos a Receita Médica
mtDNA	DNA mitocondrial
MUV	Medicamentos de Uso Veterinário
Ndna	DNA nuclear
NGS	Next-Generation Sequencing
NK	Células Natural Killer
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAE	Programa de Apoio Especial
PDGF	Fatores de crescimento derivados de plaquetas
PIM	Preparação Individualizada de Medicação
PNV	Plano Nacional de Vacinação
PRM	Problemas Relacionados com Medicamentos
PT	Prontuário Terapêutico
PVA	Preços nos estádios de produção e importação
PVF	Preço de venda à farmácia
PVP	Preço de venda ao público
RAM	Reações Adversas Medicamentosas
RDM	Regulamento de Dispositivos Médicos
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigénio

RSP	Receita sem papel
SNF	Sistema Nacional de Farmacovigilância
SNS	Sistema Nacional de Saúde
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

Capítulo 1

1. Introdução

O meu trabalho de investigação, ponto marcante para a conclusão do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas pautou-se de mudanças e nuances que contribuíram para a presente dissertação, assim como a epigenética contribui para o que somos e no que nos tornamos.

Efetivamente, no início o tema de foco era o contributo da genética na colestase neonatal e tentar perceber de que forma diferentes variantes genéticas contribuem para a patologia. Assim, tive a oportunidade de acompanhar o trabalho laboratorial desenvolvido pelo grupo de investigação no CICS – Centro de Investigação em Ciências da saúde. Acompanhada pela Doutora Patrícia Quelhas e pela Doutora Michele Breton pude presenciar a extração de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e proteína de amostras de fígado preservadas, provenientes do Brasil. O objetivo inicial seria a utilização do DNA extraído para a realização de estudos genéticos, tendo como base a sequenciação do exoma recorrendo à técnica *Next-Generation Sequencing* (NGS) no Centro de Genética Preditiva e Preventiva (CGPP) do Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), i3S – Instituto de Investigação e Inovação em Saúde. Considerando que o i3S possuía dados de NGS de estudos genéticos realizados para o Centro Hospitalar Universitário de Coimbra (CHUC), estes poderiam ser utilizados e reanalisados mediante autorização dos utentes, clínicos e aprovação à Comissão Ética do CHUC. Com a colaboração da Doutora Isabel Gonçalves, coordenadora da Unidade de Hepatologia e Transplantação Hepática Pediátrica do CHUC, do Doutor Jorge Oliveira, Diretor do Laboratório e Geneticista molecular sénior do CGPP-IBMC-i3S, e da Doutora Catarina Rosas, médica residente na Unidade de Medicina Genética do CHUC, submetemos o projeto intitulado “Análise da prevalência dos genes *SERPINA1* e *CFTR* numa amostra de pacientes portugueses com colestase neonatal de causa intra ou extra-hepática” à Comissão Ética do CHUC tendo sido obtida aprovação do mesmo projeto no dia 26 de maio de 2021. O principal objetivo do estudo submetido visa avaliar a prevalência das variantes (patogénicas, provavelmente patogénicas e variantes de significado clínico desconhecido (VUS)) associadas ao défice de alfa-1-antitripsina e fibrose quística em pacientes pediátricos diagnosticados com Atresia Biliar. Para além disso, pretendemos avaliar variantes patogénicas associadas aos genes *SERPINA1*, e *CFTR* causadores de doenças colestáticas neonatais que costumam apresentar quadro clínico-laboratorial e histopatológico indistinguíveis de Atresia Biliar.

Assim, todo o trabalho e pesquisa desenvolvida antes foi crucial para considerar pertinente a investigação do papel de epigenética na patofisiologia da Atresia Biliar, uma vez que não existem revisões sistemáticas da literatura no tema, mas existem estudos primários acerca do mesmo. Sabemos hoje que a genética não é a única envolvida no que somos, e que também o ambiente em que vivemos contribui, isto inclui todas as pequenas escolhas realizadas ao longo da vida. O genótipo possui as “instruções” para desenvolver um novo ser, mas é acompanhado do epigenoma que incorpora as condições de desenvolvimento das “instruções” referidas. Sem a epigenética os gêmeos idênticos seriam sempre iguais, sem as pequenas diferenças que os caracterizam e que são adquiridas ao longo da vida.

O mote para a presente dissertação é perceber quais os fatores epigenéticos que têm um papel crucial no desenvolvimento da atresia biliar e dar a conhecer os mesmos de uma forma sintetizada e concreta. Tendo o conhecimento destes fatores o que poderíamos fazer? Como seria se estes fatores pudessem ser controlados, não apenas na Atresia Biliar, mas também em patologias diferentes? A estas duas últimas questões não me proponho responder aqui, mas a nobre função do texto que exponho seguidamente, será fornecer as bases para que um dia seja possível integrar conhecimentos e perspetivar que seja possível responder a estas importantes questões científicas.

1.1. Anatomia e fisiologia do fígado e vias biliares

O fígado é a maior glândula e o segundo maior órgão do corpo humano, representando cerca de 2% do peso de um adulto e 5% do peso de uma criança. Está localizado no quadrante superior direito da cavidade abdominal, sendo que o seu lobo esquerdo atinge a região do quadrante superior esquerdo, apresenta-se inferiormente ao diafragma e à caixa torácica e superiormente ao estômago, intestinos e cólon [1], [2].

As duas maiores superfícies do fígado são a diafragmática (**Figura 1**) e a visceral (**Figura 2**). A superfície diafragmática do fígado é convexa e a superfície visceral ligeiramente côncava. Toda a superfície do fígado é coberta por uma cápsula de tecido conjuntivo, a cápsula de Glisson e as extensões do tecido fibroso capsular são contínuas com o tecido conjuntivo dentro do fígado. A maioria da superfície do fígado é coberta pelo peritôneo, exceto o local de fixação da vesícula biliar, a fossa *vesicae felleae*, e uma pequena área na superfície posterior, área nua, onde adere firmemente ao diafragma [1]. O hilo hepático ou porta hepatis, localiza-se na parte inferior da superfície visceral do fígado e é onde confluem o canal hepático, a veia porta e a artéria hepática.

A divisão anatômica superficial do fígado é feita em quatro lobos: direito, esquerdo, caudado e quadrado, sendo que o lobo direito é o maior dos quatro e o lobo esquerdo o mais pequeno, separados entre si pelo ligamento falciforme. Entre a fissura do ligamento venoso e a veia cava inferior figura o lobo caudado, e entre o ligamento redondo do fígado e a vesícula biliar, figura o lobo quadrado [2].

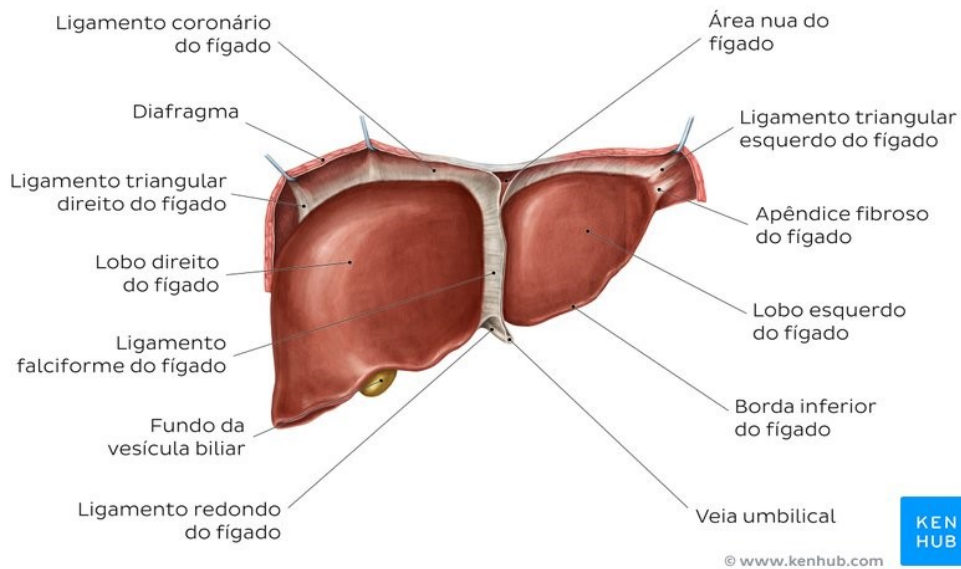


Figura 1. Anatomia da superfície diafragmática do fígado. Adaptado de <https://www.kenhub.com/pt/library/anatomia/abdomen-e-pelve>, consultado em 20 de abril de 2020.

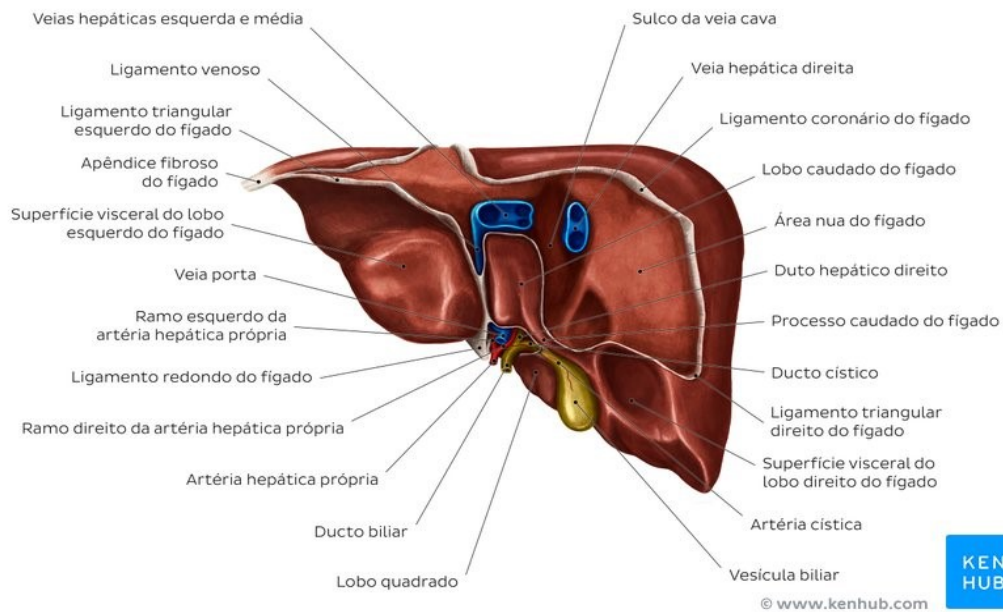


Figura 2. Anatomia da superfície visceral do fígado. Adaptado de <https://www.kenhub.com/pt/library/anatomia/abdomen-e-pelve>, consultado em 20 de abril de 2020.

A divisão funcional do fígado baseia-se na organização das estruturas vasculares e biliares. (Dooley et al., 2011) No hilo há a entrada e saída da vasculatura, sistema linfático, ductos hepáticos e infraestrutura nervosa do fígado [2]. Como já referido anteriormente a veia porta, a artéria hepática e o ducto hepático comum penetram no fígado na região do hilo. A veia porta traz sangue venoso do intestino e do baço e a artéria hepática, proveniente do eixo celíaco traz sangue arterial. Então, o sangue entra no fígado a partir da veia porta e da artéria hepática e sai pela veia hepática para a veia cava [3]. O plexo nervoso hepático acompanha a artéria hepática e ductos biliares em toda a sua extensão, acompanhando mesmo as suas ramificações. Relativamente ao sistema linfático, divide-se em três categorias, dependendo da localização podemos ter vasos linfáticos portais, sublobulares e capsulares, sendo que cerca de 80% da linfa hepática, proveniente dos sinusoides hepáticos, drena para os vasos linfáticos portais [4]. O sistema biliar extra-hepático, constitui-se dos ductos hepáticos esquerdo e direito, que se juntam e formam o ducto hepático comum [2]. Quanto ao sistema biliar intra-hepático, inicia-se nos canalículos biliares localizados entre os hepatócitos, e de seguida pelos canais de Hering (na interface entre lóbulo e espaço porta, o qual constitui o nicho das células estaminais intra-hepáticas, tanto para a formação de hepatócitos como de colangiócitos). A seguir, dentro do espaço porta temos os ductos interlobulares que seguem juntamente com artéria hepática e veia porta. Estes ductos interlobulares desembocam em ductos septais e em estruturas biliares maiores até formarem os ductos biliares direito e esquerdo e posteriormente, o ducto hepático comum, o qual encontra o ducto cístico e juntos originam o ducto biliar, ou colédoco. Todo o sistema biliar é nutrido quase exclusivamente pelo plexo vascular peribiliar, formado pelas ramificações da artéria hepática, estando suscetíveis perante lesão devido a distúrbios arteriais.

Assim, a divisão funcional hepática é baseada na organização anatómica vascular e biliar do fígado. A classificação de Couinaud define oito segmentos de acordo com as ramificações da veia porta e da artéria hepática, como representado na **Figura 3** [3]. Um plano imaginário divide o fígado em parte direita e esquerda, não idênticas ao lobo direito e lobo esquerdo descritos anteriormente, este plano imaginário divide o fígado mediante a divisão da artéria hepática nas suas ramificações direita e esquerda. Sendo que ambas as partes (direita e esquerda) são unidades completamente independentes, uma vez que recebem sangue arterial e venoso de forma separada e a sua drenagem biliar é também independente. As veias hepáticas direita e esquerda subdividem cada uma das partes em setor anterior e posterior. A ramificação principal direita e esquerda da veia porta fornece a parte direita e esquerda do fígado, respetivamente. E cada uma das ramificações divide-se para suprir os setores anterior e posterior de ambas as partes do fígado. Em cada setor há uma divisão

vascular adicional para fornecer dois segmentos, assim cada segmento possui o seu próprio sistema vascular e drenagem biliar. A parte direita do fígado é constituída pelo setor posterior direito que inclui os segmentos VI (inferior) e VII (superior), e pelo setor anterior direito onde figuram os segmentos V (inferior) e VIII (superior). A parte esquerda do fígado é constituída pelo setor anterior esquerdo que inclui os segmentos IV (medial) e III (lateral), e o setor posterior esquerdo é o único setor com um único segmento, sendo ele o segmento II. O segmento I corresponde ao lobo caudado e tem uma posição única que lhe permite receber sangue exclusivamente das ramificações da veia porta direita e esquerda, para além disso esta posição anatómica tem significado clínico nos distúrbios do sistema venoso hepático. [1]

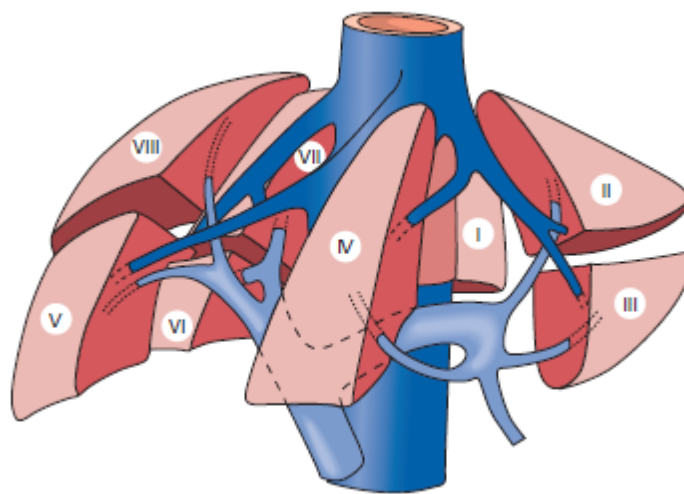


Figura 3. Representação esquemática da anatomia funcional do fígado. Adaptado de [3]

Existem atualmente três modelos conceituais para definir a estrutura microanatômica do fígado, representados na **Figura 4**, os quais consideram aspetos diferentes, que podem ser estruturais ou funcionais. Assim, os modelos são: 1) o conceito de lóbulo hepático clássico, o qual se baseia exclusivamente no conceito de unidade estrutural; 2) o conceito do lóbulo portal, baseado na direção do fluxo biliar no fígado; e 3) o conceito de ácino hepático que considera o gradiente de distribuição de oxigénio/nutrientes ao longo dos sinusóides hepáticos [5].

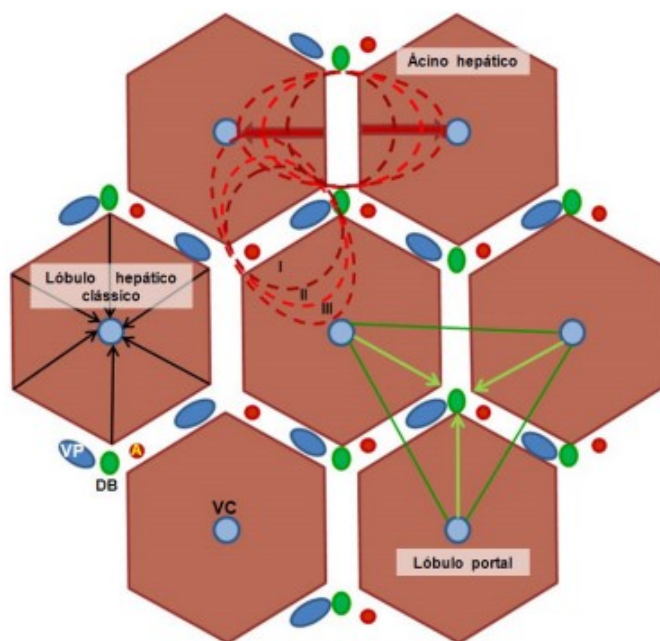


Figura 4. Esquema ilustrativo dos modelos de organização estrutural e funcional do fígado. No lóbulo hepático clássico a região periférica do lóbulo faz limites com lóbulos adjacentes e com o espaço porta, no qual se notam ramos da veia hepática (VP), ramos do ducto biliar (DB) e ramos da artéria hepática (A); enquanto o centro do lóbulo clássico é marcado pela veia central (VC). O modelo de lóbulo portal considera o fluxo da bÍlis (representado a verde); o centro do lóbulo é representado pelo ducto biliar e as suas extremidades são delimitadas pelas veias centrais de três lóbulos clássicos vizinhos. O modelo de ácino hepático baseia-se no fornecimento sanguíneo dos hepatócitos, ou seja, na qualidade do sangue, quanto à quantidade de nutrientes e oxigénio, que chega às células: a zona I, que fica próxima ao espaço porta, é rica em oxigénio e nutrientes; a zona III, próxima à veia central, é pobre em oxigénio; e a zona II é intermediária em relação à quantidade de oxigénio e nutrientes. Adaptado de Collares et al. [5].

No entanto, surgiram outros modelos para a estrutura funcional do fígado e encontram-se referidos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Modelos propostos para a estrutura funcional do fígado.

Ano	Unidade	Proposta por
1665	Arquitetura lobular	Weppler
1833	Lóbulo clássico hexagonal	Kierman
1906	Lóbulo portal	Mall
1954	Ácinos hepáticos	Rappaport
1979	Lóbulo primário	Matsumoto
1988	Sinusóide único	Bloch e McCuskey
1989	Metabólico	Lamers et al.
1989	Circuitos zonais	Quistorff and Romert
1993	Cholehepaton	Hofman
1997	Unidades microcirculatórias	Ekataksin e Wake

Apesar do conceito de unidades microcirculatórias ser o mais recente e utilizado atualmente, por questões de simplicidade e tendo em conta o objetivo da presente dissertação, utilizamos o antigo conceito do lóbulo hepático clássico, porém quando for necessário esclarecer aspetos fisiopatológicos das hepatopatias será utilizado o modelo mais recente que relaciona os conceitos da fisiologia do fígado.

Relativamente ao modelo do lóbulo hepático clássico, a cápsula de tecido conjuntivo que reveste o fígado e as extensões do tecido fibroso capsular são contínuas com o tecido conjuntivo dentro do fígado e dividem-no em lóbulos hexagonais que se organizam em volta dos ramos terminais das veias hepáticas que drenam para a veia cava. Em cada vértice dos lóbulos há um sistema porta ou tríade portal constituído por ramos da veia porta hepática, da artéria hepática e do ducto hepático.

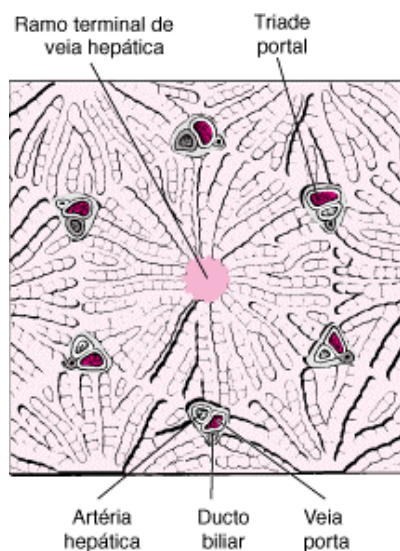


Figura 5. Lóbulos hepáticos. Adaptado de <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/profissional/>. Consultado a 30 de abril de 2020

Dispostos radialmente desde a veia central de cada lóbulo existem cordões hepáticos, compostos por hepatócitos, as células funcionais do fígado. Entre os cordões hepáticos encontramos os sinusóides hepáticos constituídos por ramificações da veia porta e da artéria hepática fundidas onde sangue arterial e venoso se misturam. O padrão tridimensional da malha de sinusóides e hepatócitos pode ser comparado a uma esponja (Dancygier, 2010). No sentido inverso, do interior do lóbulo hepático, os canalículos biliares confluem em canais biliares que conduzem a bÍlis formada no interior do lóbulo para o ducto biliar do sistema porta [5].

O tecido hepático possui uma variedade de tipos de células, para além dos hepatócitos (células parenquimatosas) contém também células endoteliais que revestem os sinusóides

(sistema vascular), colangiócitos (células epiteliais que revestem os ductos e canalículos biliares), células de Kupffer (células fagocíticas), células pit (células *natural killer*) e células estreladas hepáticas ou células de Ito (células que armazenam de gordura e retinóides e que, em situações de doença, se ligam a um perfil fibrogénico, tornando-se os miofibroblastos responsáveis pela resposta fibrogénica estereotipada do fígado) [2].

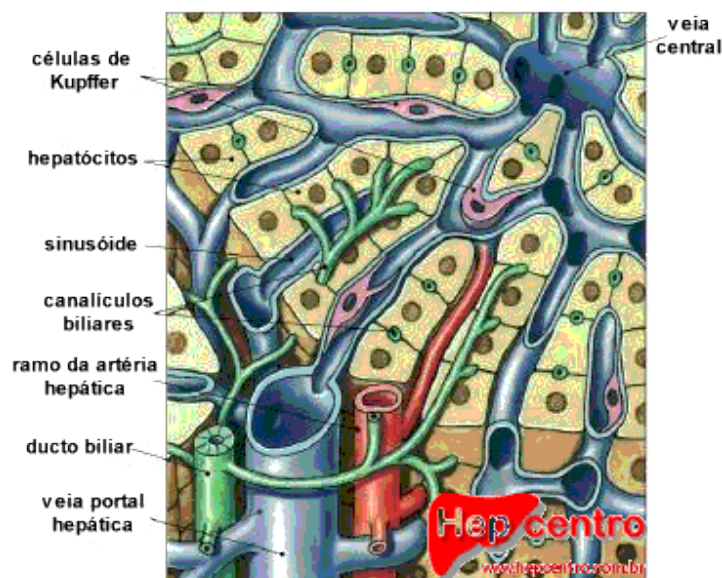


Figura 6. Estrutura celular do fígado. Autor: Hepcentro

1.2. Anatomia do sistema biliar

A anatomia do sistema biliar intra-hepático foi abordada na secção anterior, e como já foi referido os ductos hepáticos (direito e esquerdo) emergem do fígado e unem-se para formar o ducto hepático comum, o que nos leva à necessidade de explorar a anatomia do sistema biliar extra-hepático.

Efetivamente, o colo da vesícula biliar vai estreitando dando origem ao ducto cístico que, por sua vez, se une ao ducto hepático comum originando o ducto biliar comum. O ducto biliar comum percorre as camadas do omento menor, anteriormente à veia porta e à direita da artéria hepática, passando atrás da primeira parte do duodeno e entrando na segunda parte do mesmo onde percorre obliquamente à parede e se une ao ducto pancreático. A ampola de *Vater* que resulta da união do ducto biliar comum com o ducto pancreático forma uma saliência na membrana mucosa, a papila duodenal. Um espessamento de fibras musculares longitudinais e circular e, que derivam do intestino, envolvem a porção duodenal do ducto biliar comum e formam o esfíncter de *Oddi*, que permite o controlo do fluxo de bÍlis e suco pancreático [3].

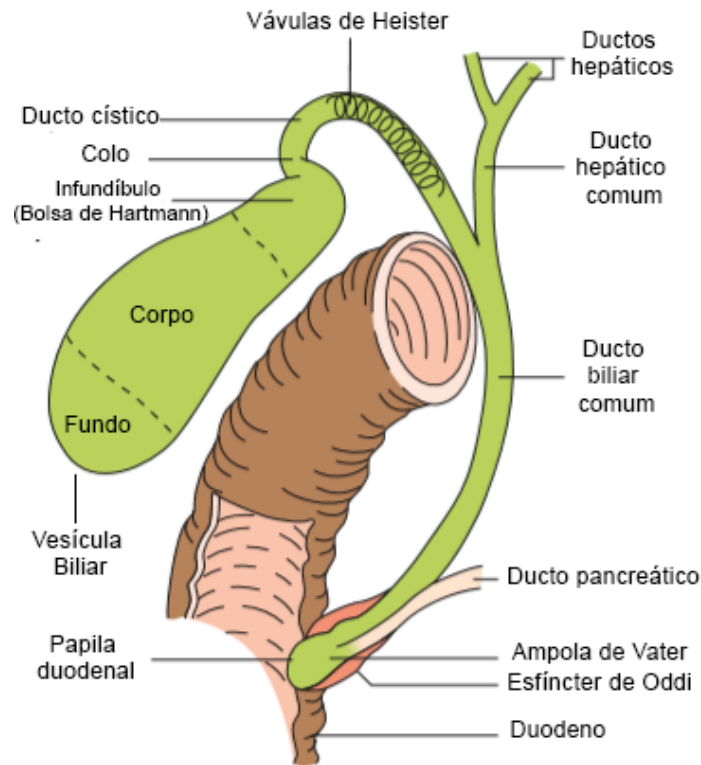


Figura 7. Vesícula biliar e trato biliar. Adaptado de Dooley et al., 2011.

A vesícula biliar é um órgão acessório em forma de pera, com cerca de 9 cm de comprimento e uma capacidade de 50mL, cuja função é armazenar e concentrar a bÍlis. A vesícula constitui-se de três partes (infundíbulo, corpo e fundo) e situa-se na face inferior do lobo direito do fígado, ficando assim acima do cólon transversal. O fundo da vesícula é mais amplo e direcionado anteriormente e o corpo estende-se até ao infundíbulo e este até ao colo que dará origem ao ducto cístico. As válvulas de *Heister* são dobras, em forma espiral, da membrana da membrana mucosa na parede do ducto cístico. A bolsa de Hartmann é uma saculação após o colo da vesícula e é um sítio comum para os cálculos biliares se acumularem. Uma vesícula biliar com uma distensão normal enche-se de bÍlis e ácidos biliares secretados pelo fígado, concentra a bÍlis através da absorção de eletrólitos e água e vai libertar a mesma no duodeno mediante influência da colecistocinina [3].

1.3. Funções do fígado

O fígado é o principal órgão metabólico na remoção de fármacos e toxinas da circulação sanguínea, sendo a sua função primária garantir a homeostase orgânica, por isso a vida não é possível sem o fígado, pois atualmente não é exequível substituir artificialmente todas as funções por ele desempenhadas e, portanto, danos ou doenças graves no fígado só podem ser tratados por transplante. [2]

Efetivamente, o fígado possui um metabolismo elevado, compartilhando substratos e energia com outros sistemas metabólicos, processa e sintetiza inúmeras substâncias que são transportadas para outras partes do corpo e realizada um conjunto de outras funções metabólicas. As principais funções metabólicas que serão destacadas nos parágrafos seguintes, comportam o metabolismo de hidratos de carbono, lípidos e proteínas [6].

O metabolismo de hidratos de carbono no fígado compreende, principalmente, o armazenamento de glicogénio; a conversão de galactose e de frutose em glicose e a realização da gliconeogénese (síntese de glicose a partir de aminoácidos, glicerol, piruvato e lactato). A glicose é o principal substrato energético, em tecidos como o cérebro e as hemácias, por isso o sangue deve ter níveis de glicose adequados entre as refeições. Assim sendo, o fígado desempenha um papel fundamental na manutenção dos níveis de glicose no sangue durante o jejum prolongado, convertendo o glicogénio armazenado em glicose (glicogenólise) e ao sintetizar glicose, principalmente a partir de lactato e de aminoácidos (gliconeogénese). Para além disso, este armazenamento de glicogénio permite ao fígado remover o excesso de glicose no sangue, armazená-la e devolvê-la ao sangue quando a concentração de glicose no sangue estiver demasiado baixa. Este mecanismo é conhecido como função de tampão da glicose do fígado [6]. O transportador de glicose localizado na membrana (GLUT2) não é regulado pela insulina, ou seja, a captação de glicose para os hepatócitos apenas depende do gradiente de concentração de glicose. Apenas 5% da glicose ingerida é usada metabolicamente pelo fígado para a síntese de glicogénio, dos 95% restantes, 30 a 40 % são convertidos em gordura e o restante permanece no fígado [1].

Os lípidos constituem alimentos e o próprio organismo, sendo que entre eles encontrados gordura neutra (triglicéridos), fosfolípidos, colesterol, ente outros. O metabolismo dos lípidos permite ao fígado, de forma geral, metabolizar a gordura, sendo que certos aspetos do metabolismo lipídico ocorrem maioritariamente nas células do fígado. Durante o processo ocorre oxidação de ácidos gordos para fornecer energia a outras funções corporais; síntese de colesterol, fosfolípidos e lipoproteínas; e ainda síntese de gordura a partir dos hidratos de carbono e proteínas. A composição lipídica dos fosfolípidos e triglicéridos compõe-se de ácidos gordos, enquanto o colesterol, apesar de sintetizado a partir de moléculas de ácidos gordos, possui um núcleo esterol. A principal função dos triglicéridos no organismo é fornecer energia para diferentes processos metabólicos, função esta compartilhada com os hidratos de carbono. O colesterol e os fosfolípidos adquirem principal importância na formação das membranas celulares e na realização de funções celulares. Então para obter energia, a gordura neutra é primeiro dividida em glicerol e ácidos gordos e posteriormente a partir dos ácidos gordos é obtida a *acetil coenzima A*, através do

processo de β -oxidação no fígado. Depois de sintetizada, a *acetil coenzima A* entra no ciclo do ácido cítrico e é libertada energia. Em média, 80% do colesterol sintetizado no fígado é convertido em sais biliares, que são libertados na bÍlis, e o restante é distribuído em todo o corpo na corrente sanguínea mediante transporte por lipoproteínas. Para além do transporte de colesterol, as lipoproteínas também transportam fosfolípidos sintetizados no fígado [6].

O corpo humano é constituído por, aproximadamente, três quartos de proteínas, onde se incluem proteínas estruturais, enzimas, nucleoproteínas, proteínas transportadoras, proteínas dos músculos que permitem a contração muscular, proteínas transportadoras de oxigénio, entre outras. Quanto à síntese proteica, é importante realçar que a maioria das proteínas plasmáticas são sintetizadas pelo fígado, por este motivo, o corpo não é capaz de dispensar a contribuição do fígado para o normal funcionamento. Durante o metabolismo proteico no fígado ocorre desaminação de aminoácidos; formação de ureia para remover amónia; formação das proteínas plasmáticas (exceto as gamaglobulinas) e ainda interconversões entre os diversos aminoácidos e síntese de outros compostos a partir deles. A desaminação dos aminoácidos ocorre, maioritariamente, no fígado e é importante para a sua conversão em hidratos de carbono ou lípidos, mas são particularmente importantes para a formação de energia. Este processo de desaminação leva à formação de elevadas quantidades de amónia que se acumula nos líquidos corporais, então o fígado sintetiza ureia a partir da amónia para que esta possa ser excretada posteriormente. Relativamente à síntese de proteínas, cerca de 90% é realizada no fígado. Quando há depleção das proteínas do plasma também coexiste rápida mitose dos hepatócitos e, conseqüentemente, crescimento do fígado, isto deve-se à rápida produção de proteínas plasmáticas para repor os valores normais. Para além disso, o fígado também é capaz de produzir outros compostos importantes e aminoácidos não essenciais a partir dos aminoácidos [6].

Para além das funções metabólicas já mencionadas, o fígado também é capaz de armazenar vitaminas (A, B12, D e K) e ferritina; formar substâncias usadas na coagulação (fibrinogénio, protrombina, globulina aceleradora, fator VII, IX e X) na presença de vitamina K é capaz de metabolizar fármacos e excretar hormonas (estrogénios, cortisol e aldosterona) e cálcio a partir da bÍlis; e ainda metaboliza bilirrubina a bÍlis. Assim, para a presente dissertação é importante compreender todo o processo de síntese e secreção da bÍlis, temática esta abordada no capítulo que se segue [3].

1.3.1. Produção, armazenamento e secreção de bÍlis

A bÍlis é um fluÍdo amarelo-esverdeado produzido pelo fÍgado e armazenado temporariamente na vesÍcula biliar, sendo posteriormente libertado no duodeno, sendo por isso de extrema importÂncia para a funçÂo gastrointestinal. [3] Na constituiçÂo da bÍlis encontramos Água, sais biliares, pigmentos biliares (bilirrubina e biliverdina), lecitina, colesterol e fosfolÍpidos dissolvidos numa soluçÂo eletrolÍtica alcalina. Os Ácidos biliares sÂo particularmente importantes na digestÂo e absorçÂo das gorduras através de emulsificaçÂo. A bÍlis excreta diversos produtos do sangue, especialmente a bilirrubina (produto final da destruiçÂo da hemoglobina) e, para além disso, é a Única via pela qual o corpo pode eliminar o colesterol em excesso. Durante a circulaçÂo entero-hepÁtica alguns dos componentes da bÍlis sÂo reabsorvidos no intestino e depois excretados novamente pelo fÍgado [7].

A secreçÂo de bÍlis pelo fÍgado é realizada em duas etapas. Primeiro uma soluçÂo inicial de bÍlis, composta por grandes quantidades de Ácidos biliares e colesterol, é secretada pelos hepatÓcitos para os canalÍculos biliares. Depois a bÍlis flui pelos canalÍculos atÉ aos septos interlobulares e desemboca nos ductos biliares terminares, fluindo para ductos maiores atÉ alcançar o ducto hepÁtico e o ducto biliar comum. Neste momento, a bÍlis é capaz de fluir diretamente para o duodeno ou ser armazenada na vesÍcula biliar, durante minutos ou horas, onde alcança o ducto cÍstico, como observamos na **Figura 7**. É durante o percurso pelos ductos biliares que a restante secreçÂo hepÁtica é adicionada à bÍlis inicial, permitindo a dissoluçÂo da mesma numa soluçÂo aquosa de iões de sÓdio e bicarbonato, o que leva à constituiçÂo da segunda secreçÂo que aumenta a quantidade total de bÍlis [6].

As cÉlulas hepÁticas secretam continuamente bÍlis, contudo em condiçÂes normais a bÍlis é armazenada na vesÍcula biliar e posteriormente é secretada para o duodeno. A vesÍcula biliar é capaz de armazenar entre 30 a 60 mL de bÍlis, no entanto atÉ 12h de secreçÂo podem ser armazenados cerca de 450 mL, uma vez que a mucosa da vesÍcula absorve continuamente Água, sÓdio, cloreto e outros eletrÓlitos, concentrando os constituintes da bÍlis [6].

Durante o processo da digestÂo inicia no trato gastrointestinal superior, a vesÍcula começa a esvaziar devido a contraçÂes rÍtmicas da parede da vesÍcula e o relaxamento simultÂneo do esfÍncter de Oddi (controla a entrada do ducto biliar comum no duodeno). As paredes da vesÍcula contraem e o esfÍncter relaxa pela estimulaçÂo da hormona colecisticinina, que por sua vez é estimulada pela presença de alimentos gordurosos no duodeno. Para além disso, há uma estimulaçÂo por fibras nervosas secretoras de acetilcolina no nervo vago e no sistema nervoso entérico. Assim, a vesÍcula esvazia a bÍlis no duodeno quando estimulada

pela colecisticinina, que é libertada em resposta à presença de alimentos gordurosos. Alimentos com menos gordura provocam um esvaziamento mais lento da vesícula biliar, em contrapartida alimentos ricos em gordura levam a um esvaziamento mais rápido. A **Figura 8** permite resumir a secreção de bÍlis, armazenamento e excreção para o duodeno [6].

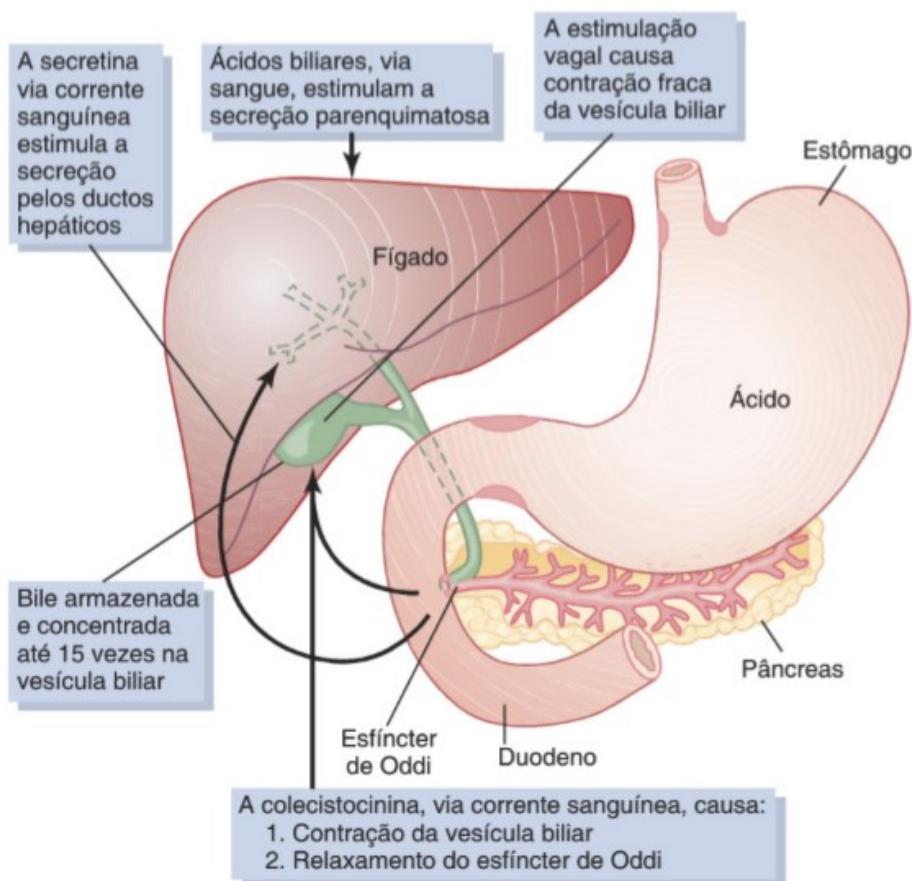


Figura 8. Secreção hepática e esvaziamento biliar. Imagem retirada de [6]

Em suma, quando alguma das etapas de secreção, armazenamento ou excreção de bÍlis se encontra alterada surgem patologias intra ou extra-hepáticas, dependendo do tipo de alteração. No presente trabalho, a patologia em questão é a Colestase neonatal, a qual pode ser resultado de disfunções intra ou extra-hepáticas, as quais irão ser abordadas no seguinte capítulo.

1.4. Colestase Neonatal

O termo colestase define os estados patológicos resultantes da redução do fluxo biliar, devido a alterações anatômicas ou funcionais do sistema biliar. Quando a colestase tem início nos primeiros três meses de vida é considerada colestase neonatal podendo, contudo,

manter-se após este período. A colestase neonatal carece sempre de uma exploração clínica urgente, uma vez que poderá ser indicativa de uma doença hepatocelular ou biliar e o seu diagnóstico diferencial é amplo e heterogêneo [8].

Efetivamente, a colestase define-se como a redução do fluxo biliar que resulta da retenção de substâncias biliares dentro do fígado, normalmente excretadas na bÍlis eliminadas no lúmen intestinal. O reconhecimento da colestase é efetuado devido à elevação da bilirrubina direta ou conjugada. Podemos definir colestase neonatal quando a Bilirrubina Direta (BD) é > 1 mg/dL. A colestase neonatal atinge cerca de 1 em cada 2500 recém-nascidos, então é importante a identificação das condições clÍnicas, uma vez que o diagnóstico e tratamento precoce estão diretamente relacionados com um melhor prognóstico [9].

Os doentes colestáticos apresentam concentrações séricas elevadas de bilirrubina conjugada, sais biliares e colesterol, habitualmente excretados na bÍlis. Os principais sinais clÍnicos presentes na colestase são icterícia, hipocolia ou acolia, colúria, prurido e xantomas (nódulos ou placas com depósitos de colesterol). A icterícia fisiológica nos recém-nascidos deve-se à lise de eritrócitos associada à imaturidade hepática aquando da metabolização da bilirrubina, assim a elevação da bilirrubina direta é frequente nos recém-nascidos durante a primeira semana de vida, contudo a sua persistência após os quatorze dias de vida de qualquer bebé com BD > 1 mg/dL torna imprescindível a investigação clínica para colestase neonatal [10].

Uma vez que a icterícia fisiológica é comum na maioria dos casos não é realizada qualquer investigação clínica o que em alguns casos contribui para o diagnóstico tardio de desordens orgânicas relacionadas com colestase. Neste sentido, é importante identificar os recém-nascidos que continuem ictericos após 14 dias de vida e fazer a sua avaliação clínica (global, coloração das fezes e urina) e laboratorial (bilirrubinas). A escala colorimétrica fecal, representada na **Figura 9**, estabelece as cores de fezes normais e as suspeitas em relação à presença de colestase neonatal. Esta escala é um método simples para avaliar a presença de hipocolia ou acolia fecal não só para os profissionais de saúde, mas também para os pais. Se existir hipocolia/acolia ou a criança apresentar elevação da bilirrubina direta deve ser realizada uma investigação pelos serviços especializados com a maior celeridade [11].



Figura 9. Escala cromática das fezes, com demonstração de fezes normais e fezes suspeitas, em relação à possibilidade de Colestase Neonatal. Adaptado da Sociedade Brasileira de Hepatologia.

Em síntese, a presença de colestase neonatal sugere-se pela icterícia, caracterizada por elevação da bilirrubina direta, diversos graus de hipocolia até acolia e colúria com a possibilidade de ocorrer prurido e xantomas, como referido anteriormente. Para além disso, pode ocorrer aumento da gamaglutamiltransferase (GGT), da fosfatase alcalina, das concentrações séricas dos ácidos biliares e do colesterol. A fosfatase alcalina é um marcador indicativo de colestase no adulto, contudo nas crianças os valores de fosfatase alcalina são inespecíficos, uma vez que os mesmos aumentam devido ao metabolismo ósseo intenso, pelo que, a GGT é o marcador específico para as alterações na síntese dos sais biliares e na secreção dos mesmos para a bília pelos canalículos. A acumulação de bilirrubina nos hepatócitos e canalículos biliares é um achado histopatológico, associado também a outros achados inespecíficos que decorrem da acumulação hepatocelular de sais biliares.

1.5. Fisiopatologia das variantes patológicas de colestase neonatal

A colestase, de um ponto de vista fisiopatológico, desenvolve-se quando o fluxo de bília é interrompido, o que leva à retenção dos seus constituintes no sangue e tecidos e à redução de sais biliares presentes no intestino, o que pode desencadear uma série de situações responsáveis pelas alterações clínicas, histológicas e laboratoriais presentes na colestase neonatal que são suscetíveis de evoluir de forma negativa ao longo do tempo [11].

A colestase neonatal, atualmente, pode ser a expressão de entidades nosológicas distintas, das quais se destacam a atresia biliar (25%), défice de alfa1-antitripsina (10%), infeções virais (5%), doenças metabólicas (20%), causas genéticas de colestase intra-hepática, entre estas a Síndrome de Alagille, a colestase familiar intra-hepática (PFIC), a colestase intra-

hepática recorrente benigna (BRIC) e o erro inato do metabolismo dos ácidos biliares (25%), para além disso apenas 15% dos pacientes são catalogados como portadores de hepatite neonatal idiopática [8]. Na **Tabela 2** encontram-se representadas as causas intra-hepáticas e extra-hepáticas da Colestase Neonatal.

Tabela 2. Causas de Colestase Neonatal. Adaptado de Santos et al., 2011

Causas Intra-hepáticas

Desordens da embriogénese	Síndrome de Allagile		
	Malformação da placa (Doença de Caroli)		
Desordens da biossíntese e conjugação de sais biliares	Défice de 3-oxo-4-esteróide 5 β -reductase		
	Défice 3 β -hidroxi-5-C27-esteróide desidrogenase		
	Défice de Oxisterol 7 α -hydroxilase		
	Défice BACAT		
Desordens do transporte e secreção por membrana	Desordens de secreção canalicular	Transporte de sais biliares – Deficiência de BSEP	Persistente progressiva (PFIC tipo 2)
			Recorrente benigna (BRIC tipo 2)
		Transporte de fosfolípidos	Défice de MDR3 (PFIC tipo 3)
		Transporte iónico	Fibrose quística (CFTR)
	Desordens complexas ou multiorgânicas	Deficiência de FIC	Persistente progressiva (PFIC tipo 1) e Doença de Byler
			Recorrente benigna (BRIC tipo 1)
		Colangite esclerosante neonatal	
		Disfunção artrogripose-renal-colestase	
Desordens hepáticas metabólicas	Desordens glandulares		
	Com envolvimento do trato biliar		
	Sem envolvimento do trato biliar		
Infeções Congénitas	Parasitária	Toxoplasmose	

	Viral	Rubéola; citomegalovírus (CMV); herpes simples; vírus hepatotrópicos (A, B e C)
	Bacteriana	Sífilis; sepsis bacteriana; infecções urinárias; listeriose; tuberculose
Desordem imune	Lupus eritematoso neonatal, Hepatite neonatal com anemia hemolítica e autoimune	
Associada a nutrição parentérica total		
Miscelânea	Histiocitose X; choque e hipoperfusão; asfixia neonatal; associada com obstrução intestinal; hepatite fibrosante com leucemia transitória (trissomia 21)	

Causas extra-hepáticas

Atresia Biliar

Cisto de colédoco

Perfuração espontânea do ducto biliar comum

Barro biliar e coletíase

1.6. Atresia Biliar

A Atresia Biliar caracteriza-se pela obstrução completa de parte ou da totalidade das vias biliares extra-hepáticas e tem início nos primeiros meses de vida. Uma vez que a Atresia Biliar é causada pela ausência de estruturas biliares funcionais, isto leva ao aparecimento de colestase, fibrose progressiva e hipertensão portal [2], [11].

A Atresia Biliar (AVB) é a causa mais frequente de colestase neonatal e o motivo principal para a realização de transplante hepático em crianças. Quando não tratada a AVB leva a doença hepática progressiva, insuficiência hepática e morte precoce. A AVB tem uma prevalência de 1:20 000 em todo o mundo e varia entre 1:17 000 e 19 000 na europa, contudo nos países asiáticos, como a China e o Japão, a sua prevalência aumenta para 1:10 000. Existe ainda o caso isolado da Polinésia Francesa em que a prevalência atinge, aproximadamente, 1:3 000 [2], [11].

Efetivamente, existem quatro formas clínicas de classificar a Atresia Biliar. A primeira é a forma embrionária ou congênita de início precoce, com icterícia desde o nascimento e está associada à ocorrência de malformações congénitas extra-hepáticas (poliesplenia, *situs inversus*, cardiopatia congénita, atresia do intestino delgado, má rotação intestinal, ducto coledóco anómalo e anomalias da veia porta e artéria hepática), constituindo a síndrome de malformação esplénica (BASM), também denominada anomalia da determinação de

lateralidade associada à atresia biliar A segunda forma clínica é a perinatal ou isolada que, normalmente, ocorre mais tardiamente, com um intervalo livre entre a icterícia fisiológica e a patológica sem malformações congénitas associadas. Para além disso, a dilatação cística dos ductos biliares remanescentes pode ser considerada como um subtipo de atresia biliar congénita, sendo estes casos referenciados como atresia biliar cística, aparecendo em 5 a 10% dos casos e considerando-se de prognóstico mais favorável. Pelo referido acima, a BASM corresponde entre 10 a 20% dos casos e a forma perinatal representa entre 80 a 90% dos casos. A terceira forma clínica é a associada ao Citomegalovírus (CMV) com sorologia IgM positiva, em que se presume que a infeção ocorra durante o período perinatal e que se traduz num pior prognóstico. A quarta e última forma é a forma cística, onde ocorre fibrosclerose das vias biliares extra-hepáticas acompanhada de quistos nestas estruturas, facilitando a sua identificação precoce através de ultrassonografia [12], [13].

O termo Atresia Biliar de desenvolvimento utiliza-se nas formas congénita e cística, onde o início será pré-natal e a sua presença é evidente no momento do nascimento, sendo mais predominante nos bebés de sexo feminino [13].

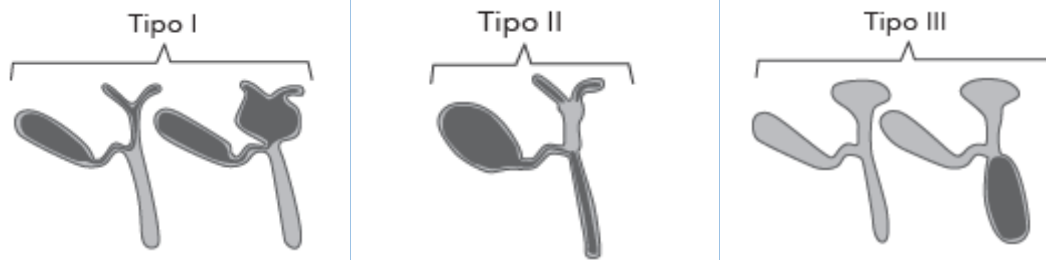
A AVB é uma colangiopatia obstrutiva dos ductos biliares intra e extra-hepáticos e assume classificações distintas mediante a localização anatómica mais proximal da obstrução extra-hepática, assim, a Japanese Society of Pediatric Surgeons define 3 tipos de AVB representados na **Tabela**

Tabela 3. Formas de Atresia Biliar de acordo com a localização anatómica da obstrução mecânica extra-hepática. Adaptado do capítulo 23 de Silva et al.,2018 [14].

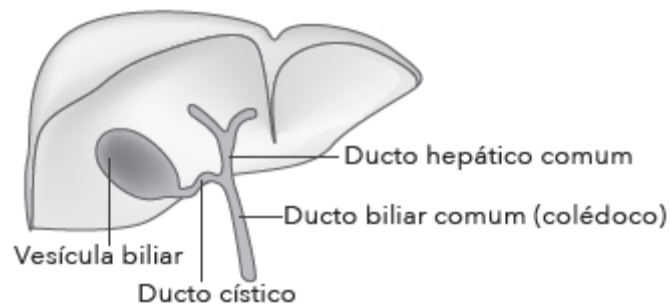
Classificação de acordo com o local da obstrução extra-hepática

Tipo I	Tipo II	Tipo III
Atresia no ducto biliar comum (colédoco), com permeabilidade das estruturas biliares proximais	Atresia no ducto hepático	Obstrução na totalidade da porta hepatis.

Estruturas com atresia biliar



Estruturas normais



Tal como referido no capítulo anterior, o diagnóstico de colestase neonatal deve ser auxiliado pela escala cromática das fezes, a qual permite a deteção de hepatopatia obstrutiva através da análise da cor das fezes dos bebés ictericos, e o diagnóstico deve ser considerado em todos os bebés com hipocolia ou acolia e/ou colúria, independentemente da idade, deve ser realizada a investigação laboratorial, mediante dosagem de bilirrubinas séricas, mesmo antes dos 14 dias de vida. Na Atresia Biliar há sempre colestase com dosagem de BD ≥ 1 mg/dL. Assim, o diagnóstico da Atresia Biliar após o nascimento pode ser realizado pela identificação de hiperbilirrubinemia, sugerindo que a lesão biliar ocorre antes ou logo após o nascimento, por exemplo, um dano durante o desenvolvimento no útero ou, em alguns casos, de etiologia genética. Após a deteção da colestase é necessário o diagnóstico diferencial entre causa intra e extra-hepática da colestase, para encaminhar os doentes com obstrução extra-hepática para intervenção cirúrgica, e os doentes com doença intra-hepática receberem tratamento adequado, caso haja tratamento disponível. O diagnóstico rápido e oportuno é importante para otimizar a resposta à Portoenterostomia (procedimento de Kasai) que tem por objetivo restabelecer o fluxo biliar. Se o procedimento de Kasai for realizado nos primeiros 60 dias de vida, 70% dos pacientes estabelecerão o fluxo biliar e após 90 dias, menos de 25% restabelecerão o fluxo biliar. Assim, o diagnóstico

tardio da AVB é um problema no mundo inteiro por vários motivos, incluindo a sobreposição visual da icterícia fisiológica e a falta de rastreio neonatal que poderia ser prontamente aplicado [9], [14].

Os sinais clínicos característicos da AVB (icterícia, acolia e colúria) e níveis de bilirrubina direta alterados encontram-se presentes desde o nascimento, sugerindo o aparecimento da doença intra-útero [15]. Para além destes sinais, pode existir hepatomegalia ou esplenomegalia desde a primeira avaliação, ou podem surgir posteriormente, juntamente com outros achados desencadeados pela hipertensão portal ou de forma isolada. Alguns bebés que apresentam a forma congénita podem apresentar sopro cardíaco ou outros problemas anatómicos. Os bebés prematuros com AVB representam cerca de 3% dos casos, sendo que a prematuridade implica um sistema biliar imaturo, uso de nutrição parental e/ou episódios de sepses, que se associa a colestase neonatal. Todas as complicações associadas à prematuridade complicam e atrasam o diagnóstico.

A etiologia da AVB permanece desconhecida, podendo representar um conjunto de fatores em associação com a constituição genética e epigenética dos doentes. Para efeitos da presente dissertação, nos próximos capítulos será exposto de que forma a poderá influenciar na fisiopatologia da Atresia Biliar.

1.7. Epigenética

O prefixo “epi” na palavra epigenética, deriva do grego e significa “acima” ou “sobre”. O DNA presente nas nossas células, não existe numa forma pura sem alterações. Sobre o nosso DNA encontramos pequenos grupos químicos acoplados em regiões específicas, ou proteínas que o cobrem em maior extensão, estas por sua vez podem estar cobertas por outras moléculas adicionais. Nenhuma destas marcas químicas que encontramos sobre o DNA altera o código genético subjacente, seja através de inserções ou deleções, mas sim modula ou altera a expressão genética, o que pode mudar as funções de determinadas células. Assim, a epigenética estuda as mudanças produzidas na expressão génica causadas por mecanismos que não envolvem a alteração na sequência de bases do DNA [16].

Efetivamente, a epigenética tornou evidente que a manifestação do fenótipo nos indivíduos depende diretamente da interação entre genótipo do indivíduo e o meio ambiente em que se insere, constituindo-se assim como um dos temas de maior interesse da atualidade no estudo dos processos biológicos. Considera-se um fenómeno epigenético o facto de

determinadas características, não envolvendo mudanças na sequência do DNA, possam permanecer estáveis ao longo de gerações.

Como referido anteriormente, o DNA acumula marcas químicas que determinam a expressão dos genes, ao conjunto destas marcas chamamos epigenoma. Consideremos o caso de gêmeos geneticamente idênticos, ao longo do seu desenvolvimento vivem diferentes experiências, e estas experiências por sua vez reorganizam as marcas químicas presentes, o que leva os gêmeos a terem comportamentos, habilidades e até saúde diferente. Assim, sabemos que o epigenoma pode ser alterado por influências positivas, como oportunidades de aprendizagem ou sentimentos positivos, mas também pode ser afetado por influências negativas, como agentes tóxicos, stress, ambientes poluídos, fármacos, entre outros. As alterações nas marcas epigenéticas regem a expressão dos genes e condicionam o que acontece, deixando uma “assinatura epigenética” única, a qual pode ser temporária ou permanente. Sabe-se hoje que experiências prejudiciais como a desnutrição, exposição a toxinas ou drogas e o stress antes do nascimento ou nos primeiros anos de vida levam a alterações epigenéticas que podem afetar múltiplos sistemas orgânicos e aumentar o risco em maus resultados na saúde física e mental do indivíduo, bem como comportamentos e capacidades de aprendizagem futuras [16]–[18].

Assim, as modificações dos padrões epigenéticos normais podem levar ao aparecimento de patologias, no caso da presente dissertação, considera-se a relação destas modificações na patofisiologia da Atresia Biliar em recém-nascidos.

1.7.1. Mecanismos epigenéticos

Os principais mecanismos epigenéticos incluem a metilação do DNA, modificações das histonas e RNAs não codificantes, como o microRNA (miRNA). A **Figura 10** mostra os principais mecanismos epigenéticos referidos.

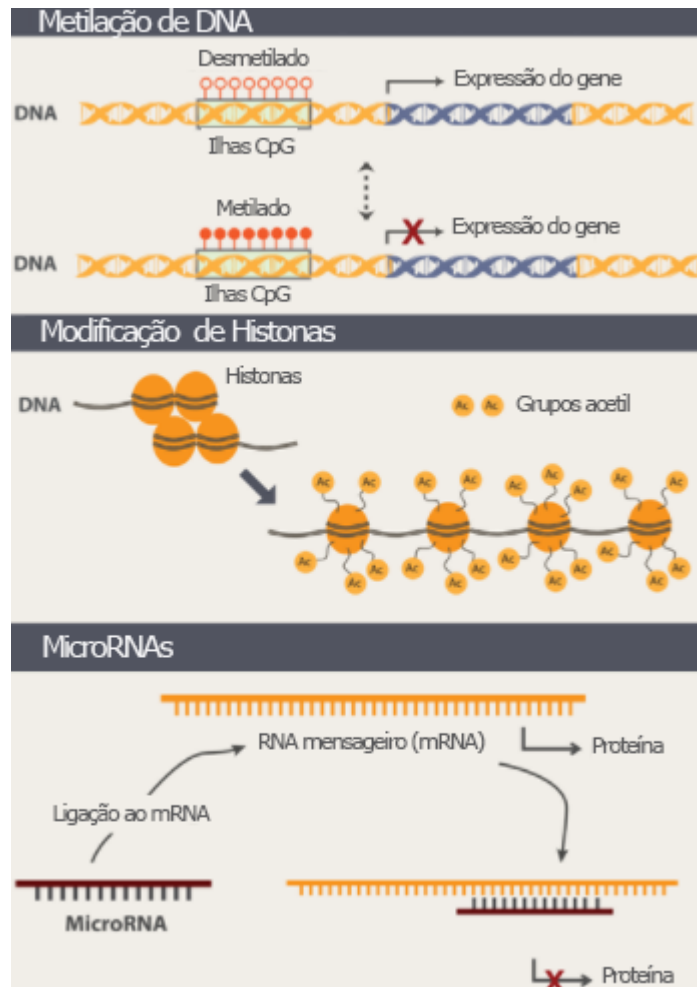


Figura 10. Mecanismos epigenéticos. Imagem adaptada de <https://knowingneurons.com/>

De uma forma geral, quando um grupo metil é adicionado ao carbono 5 da citosina forma 5-metilcitosina, ocorrendo assim metilação direta do DNA. Esta metilação leva ao silenciamento ou redução da expressão do gene, afetando a interação entre o DNA e outras proteínas. As modificações das histonas afetam o DNA indiretamente. Outro mecanismo envolve as modificações nas histonas, proteínas globulares, em torno das quais o DNA se enrola e forma os nucleossomas que permitem o enrolamento do DNA em cromossomas dentro do núcleo da célula. As modificações das histonas alteram o acesso aos nucleossomas e ocorrem por reações catalisadas por enzimas, tais como a acetilação da lisina, metilação da lisina/arginina, fosforilação da serina/treonina, entre outras. Estas modificações podem então resultar na promoção ou inibição da transcrição génica. Relativamente aos microRNAs, são um tipo de RNAs não codificantes, apresentando de 19 a 25 nucleótidos e que desempenham um papel importante na expressão génica. Uma vez que o miRNA não pode ser traduzido, a sua função principal passa por diminuir a expressão génica de diferentes formas, como a clivagem do mRNA, inativação translacional e desadenilação.

Efetivamente, os mecanismos referidos são responsáveis pela iniciação e manutenção do silenciamento epigenético e regulação da expressão génica, sendo também essenciais em processos celulares diversos, como a diferenciação celular, expressão génica, inativação do cromossoma X, embriogénese e o *imprinting* genómico. [19] [20]

1.7.2. A influência epigenética no fígado

O fígado é essencial para a manutenção da homeostase geral, mas possui uma variação interindividual substancial no metabolismo, na síntese de proteínas, na regulação dos nutrientes, e na desintoxicação de xenobióticos, por isso é essencial entender a variação individual da expressão génica, fatores genéticos específicos para o fígado ou outras condições que o afetem. Como ponto fulcral desta dissertação estão os mecanismos epigenéticos, que desempenham um papel extremamente importante na regulação da expressão génica [21].

As modificações epigenéticas são altamente plásticas e responsivas ao ambiente, por isso é importante compreender o papel dos fatores ambientais e como escolhas e estilos de vida podem ter impacto na patologia. Este conceito dos fatores ambientais capazes de induzir traços adaptativos estáveis, que podem ser transmitidos entre as gerações, deriva de uma teoria da evolução proposta por Lamarck [22].

Efetivamente, existem algumas evidências relevantes a serem consideradas, como estudos que descrevem as adaptações epigenéticas hereditárias transmitidas paternalmente e que afetam a função hepática. Também os estudos realizados em ratos machos consanguíneos alimentados com uma dieta pobre em proteínas, deram origem a uma descendência com expressão hepática elevada de genes que regulam o metabolismo de lípidos e colesterol. Um dos fatores que surge associada à Atresia Biliar é a fibrose hepática, a qual é mencionada na literatura pela sua modulação epigenética [22], [23].

Assim, nos capítulos seguintes serão apresentados os mecanismos epigenéticos presentes na literatura, bem como os fatores ambientais que os moldam para o aparecimento da patologia.

1.8. Objetivo

O principal objetivo deste trabalho foi integrar a informação disponível nos estudos científicos sobre o papel dos fatores epigenéticos e ambientais na patofisiologia da Atresia Biliar e eventualmente, fatores epigenéticos ambientais mais preponderantes e descritos para a patofisiologia e aparecimento da patologia em recém-nascidos.

2. Metodologia

Inicialmente para a elaboração da presente dissertação, foi realizada uma pesquisa não sistematizada da literatura para contextualizar as doenças colestáticas da infância e a atresia biliar, bem como a epigenética e a sua influência na patologia.

Efetivamente, para avaliar qual seria o papel da epigenética e quais os fatores epigenéticos envolvidos na patofisiologia da atresia biliar foi realizada uma revisão sistemática da literatura. A pesquisa bibliográfica foi efetuada em bases de dados indexadas, sendo elas, PubMed, Scopus, ProQuest, PubMed Central (PMC) e Web of Science. A *QUERY* utilizada foi: (("liver disease" OR cholestasis) AND ("Biliary Atresia" OR BASM OR "biliary atresia splenic malformation" OR cholangiopathy) AND (genes OR epigenetic OR epigenetic regulation OR pathophysiology OR MDA OR DAPM OR flavonoids OR phytosterols OR sterols OR steroids OR estrogens OR bilitresone OR "endocrine disruptors" OR "DNA methylation" OR "DNA Methyltransferases" OR "Translocation Proteins" OR "Histone Modification" OR "Noncoding RNA" OR microRNA OR "environmental factors" OR environment)).

Após a pesquisa em todas as bases de dados, o número total de artigos obtidos foi de 4297 e os mesmos foram geridos com apoio de uma plataforma de gestão de referências (RAYYAN), sendo eliminados os artigos duplicados, artigos em línguas que não o inglês, artigos de revisão, e todos aqueles que não respondiam ao objetivo proposto. Foram analisados depois 314 artigos, os quais foram selecionados por pares em conjunto com o Professor Doutor Jorge Santos, e posteriormente confirmados pelo Doutor Jorge Oliveira. O número total de trabalhos científicos incluídos para a elaboração da revisão sistemática é de 73 artigos.

3. RNAs não codificantes

3.1. MicroRNAs

A expressão de numerosos microRNAs (miRNAs) é alterada em quase todas as doenças hepáticas agudas ou crônicas. Os miRNAs desempenham papéis bem definidos na proliferação celular, diferenciação, morte celular, organogênese e manutenção das funções dos órgãos, assim sendo, vários estudos apontam para uma clara evidência da associação dos miRNAs à diferenciação dos hepatócitos e colangiócitos, e no surgimento de inflamação e fibrose hepática. Para além disso, muitas vezes os miRNAs podem ser utilizados como importantes biomarcadores para a sinalização da doença [24], [25].

Efetivamente, os miRNAs atuam através da ligação imperfeita a sequências complementares na 3'UTR do alvo mRNA, levando assim à clivagem do mRNA ou repressão da tradução proteica. Assim, os miRNAs são conhecidos por desempenhar um papel fundamental no silenciamento de genes-alvo, induzindo a degradação de mRNA, repressão translacional e/ou desestabilização [26]–[28].

A expressão dos miRNAs específicos em células e tecidos é essencial no desenvolvimento dos órgãos dos seres vertebrados, e em inúmeras patologias os miRNAs surgem desregulados, incluindo na AVB. Alguns estudos identificaram populações de miRNAs estáveis presentes no plasma livre de células e no soro, assim, estes miRNAs circulantes podem refletir a expressão alterada ou lesão tecidual e distinguir distúrbios semelhantes [29].

Os padrões de expressão dos miRNAs no soro permitem detetar várias doenças e distinguir distúrbios semelhantes, uma vez que os níveis séricos de miRNAs são reprodutíveis, estáveis, e consistentes entre indivíduos. Assim, atualmente os miRNAs são propostos como biomarcadores não invasivos com utilidade clínica e diagnóstica na AVB e outras doenças. Um estudo que se propôs a caracterizar sistematicamente os miRNAs no soro, defende que o perfil de miRNAs séricos é único para cada doença e serve como indicador da função biológica, podendo assim ter um grande impacto no diagnóstico e na medicina personalizada do futuro [30], [31].

Os níveis séricos de miRNAs refletem condições fisiológicas, como por exemplo a gravidez e existe um grande subconjunto de miRNAs que se expressa quase exclusivamente na

placenta. O papel dos miRNAs placentários permanece desconhecido e não se conhece se podem influenciar a fisiologia. Por exemplo, a expressão distinta de miRNAs na placenta em caso de pré-eclampsia reforça a possibilidade de que os níveis séricos de miRNAs possam ser biomarcadores para esta e outras doenças [32].

A ausência de biomarcadores confiáveis e não invasivos para o diagnóstico da AVB contribui para o diagnóstico tardio e consequente pioria na evolução do doente. Por isso, a possibilidade de utilizar os miRNAs enquanto biomarcadores não invasivos é promissora [29].

Nas secções seguintes serão apresentados os miRNAs mais intimamente relacionados à patologia hepática, encontrados na literatura.

3.1.1. MiR-30

A regulação positiva da família miR-30 durante os estágios de desenvolvimento, onde o miR-30 é expresso na placa ductal regula o TGF- β , essencial para a diferenciação dos hepatoblastos em colangiócitos e hepatócitos. Em 25% dos casos de Atresia Biliar há falha na morfogênese da placa ductal. O miR-30a e miR-30c são expressos especificamente em colangiócitos, e foi demonstrado em peixes zebra que a depleção do miR-30a prejudica a formação do ducto biliar [25], [27].

Para além disso, Bessho et al. propõem que a expressão de miR-30b em colangiócitos e células subepiteliais module os mecanismos patogénicos da doença pela regulação dos seus genes alvo. O miR-30b apresenta maior número de genes alvo de expressão aumentada, aquando da obstrução dos ductos e na atresia, e uma maior associação com genes que regulam a inflamação e a imunidade, processos biológicos claramente envolvidos na patofisiologia da AVB [33].

3.1.2. MiR-29

No tecido hepático o microRNA-29a-3p é o mais abundante membro da família miR-29, responsável por 70% da expressão total. A família miR-29 está envolvida em diversas ações, particularmente nos genes que codificam o colagénio e DNA metiltransferase (*DNMT1* e *DNMT3*) [27]. Níveis elevados do miR-29 demonstram ter efeito antifibrótico ao suprimir o colagénio 1A1 mRNA e a sua expressão proteica, reduzindo a ativação das células estreladas (HSCs). Níveis diminuídos de miR-29, levam ao aumento da fibrose nos doentes com Atresia Biliar. Na AVB há lesão hepática acompanhada de inflamação, seguida de

fibrose e deposição de matriz extracelular (ECM), distorcendo o parênquima hepático normal e provocando obliteração dos ductos hepáticos extra-hepáticos e hipertensão portal. As HSCs são as principais fontes de ECM e atualmente têm sido investigadas as suas funções e potencial como alvos terapêuticos para reverter a fibrose, juntamente com os miRNAs que atuam na sua ativação [25].

Estudos apontam para o envolvimento da transição epitélio-mesenquimal (EMT) na formação de miofibroblastos fibrogênicos na fibrose hepática, estando associada a ocorrências de AVB e cirrose hepática primária. O TGF- β e outros fatores de crescimento podem induzir e regular a EMT. Níveis mais baixos de miR-29c são característicos em doentes com AVB. A estimulação do miR-29c com TGF- β 1 diminui significativamente a sua expressão e induz EMT nas células. A EMT é atualmente conhecida como via patológica chave no aumento do número de células fibrogênicas e uma fonte de fibroblastos. Para além disso, sabendo que a metilação do DNA está também envolvida na patogénese da atresia biliar, *DNMT3A* e *DNMT3B* são genes alvo do miR-29c que se liga à região 3'UTR de ambos os genes e regula negativamente a sua expressão, suprimindo a expressão do fenótipo AVB. A diminuição do miR-29c promove a fibrose associada à atresia biliar que é induzida pelo TGF- β por direcionamento de *DNMT3A* e *DNMT3B* [27], [34].

Hand et al. identifica dois alvos diretos do miR-29, o *Igf1* e o *Il1RAP*, que influenciam a sobrevivência do colangiócito e modulam a inflamação, respetivamente. Com o aumento da expressão de miR-29, *Igf1* é regulado negativamente e há um aumento da probabilidade de morte celular de colangiócitos, que pode levar a uma colangiopatia em doentes com AVB. *Il1RAP* está envolvido na sinalização de IL-1, através do recetor IL-1RA. A expressão aumentada de miR-29 regula negativamente a sinalização através do IL-1, tornando-se num mecanismo adaptativo que modera a resposta inflamatória [27].

3.1.3. MiR-let7a-5p

O *ABCC2* (*ATP Binding Cassette Subfamily C Member 2* ou *MRP2*) é um transportador de efluxo multiespecífico, dependente de ATP e localizado na membrana canalicular do fígado. São transportados por esta glicoproteína um grande número de aniões anfipáticos orgânicos multivalentes desde o fígado até à bÍlis, incluindo glucoronídeos de bilirrubina, conjugados de glutathiona, leucotrienos e alguns substratos glucoronados e sulfatados. Para além de outras funções, o *ABCC2* desempenha um papel principal na excreção biliar de bilirrubina conjugada. O miRNA-let7a-5p regula a expressão do *ABCC2* no fígado normal e colestático [24].

3.1.4. MiR-4429 e miR-4689

Estes miRNAs são diferencialmente expressos e podem desempenhar funções importantes na patogénese da AVB, através da regulação dos seus genes alvo, podendo ainda desempenhar um importante papel enquanto biomarcadores no diagnóstico da AVB.

Num estudo realizado em amostras de soro de bebés com ABV e Colestase Neonatal sem AVB, uma análise de enriquecimento funcional mostrou que o GNAI1 (subunidade alfa I1 da proteína G) é alvo do miR-4429 e é significativamente relacionada com a função da via de sinalização do recetor acoplado à proteína G. Para além disso, a secretina pode contribuir para a colerese ductular após a estimulação do recetor acoplado à proteína G e da via de sinalização dependente de cAMP/ proteína cinase A (PKA). Para além disso, os genes alvo do miR-4429 estão significativamente envolvidos na via de sinalização mTOR e PI3K-Akt, cuja ativação acelera a migração e proliferação das células estreladas hepáticas. Os genes alvo do miR-4689 são extremamente enriquecidos na via de sinalização FoxO. A AVB manifesta-se pela inflamação progressiva e fibrose das vias biliares que pode levar à cirrose. A via de sinalização FoxO3/Bim é relatada como claramente ativada em doentes com cirrose biliar primária. Assim, o estudo defende que miR-4429 e miR-4689 podem desempenhar papéis importantes na AVB, pela regulação dos genes alvo que participam das vias de sinalização [31].

3.1.5. MiR-200b/429

Num estudo em que se examinou a capacidade dos miRNAs séricos para distinguir AVB de outras formas de hiperbilirrubinemia, foram usadas amostras do soro humano obtidas de um estudo longitudinal prospetivo. Neste mesmo estudo, o cluster miR-200b/429 teve um bom desempenho no diagnóstico da AVB, classificando 85% dos casos de forma correta [29].

O cluster miR200b/429 possui uma assinatura específica na AVB, aumentando significativamente no soro das amostras de pacientes com AVB. É observada uma expressão aumentada de miR-200b/429 nos ductos biliares extra-hepáticos sugerindo que a elevação do miR-200b/429 no soro dos doentes com AVB resulta da destruição dos ductos biliares extra-hepáticos, característica exclusiva nestes casos [29].

Xiao et al. identificaram um mecanismo molecular no qual miR-200b apresenta um papel relevante no processo de fibrose hepática, uma vez que regula negativamente a proteína

FOG2 e há a ativação da via de sinalização Akt nas HSCs, que consequentemente são ativadas [35].

3.1.6. MiR-21

Os níveis de miR-21 são mais elevados em bebês com AVB, em comparação com bebês saudáveis e doentes da mesma idade com outras doenças colestáticas [36].

Num estudo que avaliou o papel do miR-21 durante a lesão colestática, em modelos colestáticos de ligação do ducto biliar (BDL) e *Mrd2^{-/-}* (*multidrug resistance gene-2-Knockout*) é observado que o miR-21 é regulado positivamente no fígado total e nos colangiócitos. Além disso, em colangiócitos e células estreladas hepáticas, o miR-21 promove a proliferação e fibrose e diminui a apoptose. As HSCs ativadas excretam fatores promotores de fibrose que aumentam a lesão hepática. O miR-21 é capaz de regular a ativação das HSCs e a sinalização de Smad, que por sua vez estimula a fibrogênese. A sinalização de Smad pode influenciar a ativação das HSC e a proliferação de colangiócitos em modelos de lesão hepática. A diminuição de miR-21 aumenta a expressão de Smad-7 no fígado total e colangiócitos isolados, reforçando a evidência de que a o miR-21 aumenta a fibrogênese durante a lesão hepática [37].

Alguns estudos em conjunto com o trabalho anteriormente referido, sugerem que o miR-21 regula a fibrose hepática através da modulação da ativação e proliferação das células estreladas hepáticas. Além disso, o miR-21 é regulado positivamente em colangiócitos após lesão, aumenta a proliferação de colangiócitos e impede os processos apoptóticos de colangiócitos. Este aumento da ativação das HSCs e proliferação dos colangiócitos pode ser impulsionado pela regulação do miR-21 do Smad-7 [37].

Makhmudi et al. descreveram novos dados sobre o miR-21 em doentes da indonésia, mostrando que a expressão do miR-21 é maior com doentes com AVB do que nos controles saudáveis. Para além disso, a expressão de miR-21 diferiu entre os doentes com cirrose e sem cirrose. A regulação positiva de miR-21 é colocada como hipótese na sua contribuição na fibrose hepática em pacientes com AVB, pela inibição de PTEN através do 3'-UTR, aumentando a expressão de α -SMA [38].

Efetivamente, um estudo efetuado na China sustentou as conclusões de Makhmudi e colaboradores, defendendo o PTEN como um alvo do miR-21, bem como regulador negativo da via AKT (regulada negativamente por PTEN, ativa a apoptose e bloqueia a proliferação e

o crescimento celular). O miR-21 inibe PTEN e por sua vez ativa a via AKT, via desfosforilação por PTEN. A sinalização AKT inibe a apoptose das células estreladas hepáticas e estimula a sua proliferação. A transdiferenciação das células estreladas em miofibroblastos é acompanhada pela expressão de actina alfa2 (ACTA2), processo crítico durante a fibrogénese do fígado. Neste estudo a expressão de ACTA2 é aumentada em doentes com AVB, sugerindo que as células estreladas ativadas promovem a fibrose hepática na AVB. É então sugerido que o eixo miRNA-21/PTEN/AKT desempenhe uma função crucial no processo de fibrogénese hepática pela ativação das células estreladas [39].

3.1.7. MiR-145

Num estudo em que foi testada a expressão da aducina 3 (*ADD3*), gene identificado como gene de suscetibilidade para AVB, o miR-145 foi identificado como seu regulador *upstream* na patogénese da AVB. A aducina 3 é uma proteína da membrana esquelética que contribui na montagem da rede espectrina-actina nos glóbulos vermelhos e na regulação da adesão célula-célula em tecidos epiteliais, como é o caso do fígado e do trato biliar. Existe uma expressão maior de mRNA de *ADD3* em amostras de fígado com AVB, comparativamente a amostras de controlo, sugerindo que a expressão desregulada de *ADD3* possa contribuir para a AVB. A expressão aumentada de *ADD3* pode facilitar a deposição de actina, a adesão e a acumulação de células epiteliais, o que pode resultar em contração e fluxo biliar insuficientes, exacerbando a colestase. Isto pode causar acumulação de ácidos biliares, agravando assim o progresso da fibrose hepática e promovendo a proliferação de colangiócitos, induzindo a obliteração do trato biliar [40].

ADD3 encontra-se regulado positivamente nos tecidos hepáticos da AVB, enquanto o miR-145-5p é regulado negativamente. Para além disso, *ADD3* é um alvo direto para o miR-145-5p e quando regulado negativamente, regula positivamente a expressão endógena de *ADD3*, contribuindo assim para a fibrose hepática na atresia biliar [40].

3.1.8. MiR-140-3p

Num estudo que se propõe a identificar miRNAs circulantes na AVB pela técnica de NGS, miR-140-3p é diferencialmente expresso. Todos os doentes com AVB incluídos no estudo, expressam baixos níveis de miR-140-3p e este é o único miRNA que poderia distinguir a AVB de outras causas de Colestase Neonatal, destacando o seu potencial no diagnóstico enquanto biomarcador. Além disso, o fato de crescimento de fibroblastos 9, um dos genes alvo do miR-140-3p, ativa o principal efetor intracelular quinase regulado por sinal

extracelular (ERK)/MAPK, relacionado com a produção de colagénio tipo I e III, durante o desenvolvimento da fibrose hepática [41].

3.1.9. Outros microRNAs

Na **Tabela 4** encontram-se enumerados outros microRNAs com funções na AVB, para além dos apresentados anteriormente e que se encontram descritos em menor extensão na literatura, carecendo de mais estudos para avaliar as suas características e papel na Atresia Biliar.

Tabela 4 MicroRNAs referidos em menor extensão na literatura.

MicroRNA	Caraterísticas
MiRNA-29b e miR-142-5p	Expressão aumentada na atresia biliar [27], [42].
MiR-483-3p/-5p	Juntos contribuem para a inibição da fibrose hepática, uma vez que têm como alvos dois fatores pró-fibrogénicos, o FGF- β (fator de crescimento β) e o inibidor de tecido da metaloproteinase 2, que suprime a ativação das HSCs [25].
MiR-19b	Níveis baixo em amostra de pacientes com AVB, comparativamente com os controlos. MiR-19b é regulado negativamente nas HSCs inibindo a ativação das mesmas. Regula TGF- β , reconhecido como a citocina fibrogénica mais potente que regula a produção de colagénio das HSCs através de sinalização autócrina e parácrina [43].
MiR-155	Expressão aumentada em fígado de doentes com AVB, existindo uma relação inversa entre miR-155 e o supressor de sinalização de citocinas 1 (SOCS1), para uma resposta imune via INF- γ [44].
MiR-499	O polimorfismo rs3746444 pode afetar a afinidade do miR-499, interferindo na ligação perfeita ao mRNA alvo e, portanto, pode modificar a suscetibilidade à AVB e afetar a concentração de citocinas inflamatórias, que pode estar associado à gravidade da doença e ao resultado após a operação de Kasai [45].

MiR-513	O miR-513 regula a tradução de B7-H1 (papel imunoregulador crítico em respostas imunes mediadas por células) e está envolvido na expressão de B7-H1 induzida por INF- γ (citocinas pró-inflamatórias) em colangiócitos humanos, sugerindo um papel para o silenciamento genético mediado por miRNA na regulação da resposta de colangiócitos ao INF- γ . O miR-513 tem como alvo a região 3'UTR de B7-H1, resultando na repressão translacional [46].
MiR-181	A ativação das HSCs e subsequente desenvolvimento de fibrose é em parte controlado por PTEN, expresso através de uma cascata e reações envolvendo miR-181b [25].
Cluster miR-23b	A formação do ducto biliar em hepatócitos de ratos é reprimida por níveis altos de miR-23b, miR-27b e miR-24-1. Baixos níveis de miR-23b em colangiócitos permite a sinalização TGF- β e desenvolvimento do ducto biliar [25].

3.2. RNA não codificante longo

Os RNAs não codificantes longos (lncRNAs) são um grupo de transcritos com menos de 200 nucleóticos de comprimento, mas e que não codificam para proteínas. O lncRNA H19 é um gene marcado e expresso apenas na mãe e é conservado em humanos e ratos, indispensável na regulação da proliferação e diferenciação celular. Xiao et al. demonstraram que a expressão hepática de H19 é aumentada em doentes com AVB. De uma forma geral, o nível de expressão de H19 exossômico está intimamente relacionado com a gravidade e progressão da lesão hepática colestática e da fibrose hepática em doentes com AVB. Assim, o estudo ainda refere que o H19 regula as vias mediadas por S1PR2/SPHK2- e let-7/HMGA2 -, estando implícita a sua influência na regulação da proliferação dos colangiócitos e na fibrose hepática [47].

4. *Stress* Oxidativo

O *stress* oxidativo constitui a principal causa de danos ao DNA em células humanas, o que se deve principalmente a uma produção exagerada de espécies reativas de oxigênio (ROS). A geração de ROS pode levar a uma ampla gama de lesões “mutações” no DNA, incluindo deleções de bases, quebra de ligações no DNA, rearranjos cromossômicos e ligações cruzadas com proteínas. O dano oxidativo pode mesmo mudar as alterações epigenéticas por múltiplos mecanismos [48].

A glutathiona (GSH) é um importante antioxidante que protege o fígado contra os danos oxidativos e várias doenças hepáticas partilham como características comuns a glutathiona celular reduzida e *stress* oxidativo elevado

Assim, nos próximos capítulos será abordado o papel do *stress* oxidativo na AVB e de que forma este se relaciona com os níveis de GSH.

4.1. Toxinas

4.1.1. Biliatresona

Os veterinários australianos relataram, em 1990, um surto de doença semelhante à Atresia Biliar em cordeiros recém-nascidos, o mesmo terá sucedido em 1964 e 1988, anos estes em que as secas foram severas e o pastoreio das ovelhas prenhas passou a ser de flora atípica, constituída por plantas do género *Dysphania*, sugerindo uma etiologia tóxica das mesmas. A hipótese formulada na época proponha que as ovelhas prenhas ingeriam uma toxina vegetal que passava para o feto e assim, os cordeiros nasciam doentes [49], [50].

Efetivamente, foi isolado e purificado, na bÍlis presente no colédoco de peixes zebra, um isoflavonóide de ocorrência natural em *Dysphania glomulífera* e *D. littoralis*, a biliatresona (1,2-diaril-2-propenona) representada na **Figura 11**. Foi demonstrado que a biliatresona enquanto toxina causa uma síndrome semelhante à Atresia Biliar em peixes zebra, com destruição seletiva dos ductos biliares extra-hepáticos. [51]

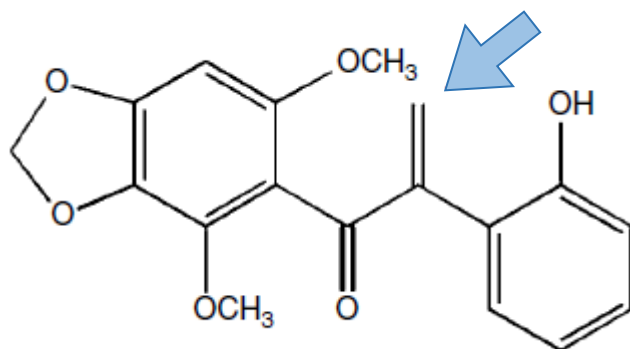


Figura 11. Estrutura química da biliatresona. A seta azul aponta para a porção eletrofílica da biliatresona que se liga covalentemente à glutatona reduzida, aminoácidos e ácidos nucleicos, proporcionando assim uma hipótese da base mecanicista da toxicidade.

A biliatresona reage fortemente com a glutatona (GSH), diminuindo os níveis de GSH, o que causa destabilização dos microtúbulos, essenciais para a manutenção da polaridade apical, e extravasamento da toxina e bÍlis para o espaço periepitelial. Para além das diminuições transitórias de GSH, a biliatresona também causa diminuição transitória do SOX17, em colangiÓcitos em cultura, e esta redução de GSH é suficiente para provocar lesão nos colangiÓcitos e fibrose subepitelial em explantes e ductos biliares extra-hepáticos neonatais. O anteriormente referido sugere que alguma toxina ou agente stressante reduz a GSH e é excretado na bÍlis do recém-nascido, causando lesão. Zhao et al. defende ainda que o mecanismo para a diminuição de GSH possa ser a diminuição de GSR (Glutathione Redutase) que reduz GSSH a GSH, uma vez que defeitos no gene implícito no metabolismo da glutatona causou alterações no potencial redox dos colangiÓcitos e os sensibilizou diferencialmente à biliatresona [51], [52].

A suscetibilidade à biliatresona é diretamente proporcional à oxidação dos colangiÓcitos, sendo os colangiÓcitos extra-hepáticos (EHCs) mais oxidados relativamente aos intra-hepáticos (IHCs) os estudos comprovam que a biliatresona causa destruição seletiva dos ductos biliares extra-hepáticos em peixes zebra, apesar da anatomia dos mesmos não ser igual à de um humano, e por sua vez esta evidência suporta a hipótese de que as toxinas podem de facto causar Atresia Biliar. Para além disso, os achados são consistentes com a relação de causalidade entre a biliatresona e a doença, e incluem lesão primária dos ductos biliares extra-hepáticos, perda de adesão célula-célula, mudanças na polaridade dos colangiÓcitos, aumento da permeabilidade do epitélio, e resultam numa ativação dos miofibroblastos e fibrose. Estes eventos são secundários a reduções da glutatona e acompanhados pela depleção do fator de transcrição SOX17 [51].

É importante referir que o SOX17 é mencionado em outros artigos que evidenciam a extrema importância do mesmo na morfognese da vesícula biliar, bem como dos ductos

biliares, e na maturação durante os estágios mais tardios da organogénese. Assim, os autores defendem que haploinsuficiência do SOX17 poderá estar implícita na patogénese da atresia biliar congénita [53], [54].

Em Zhao et al. demonstram que a exposição à biliatresona leva à ativação das vias de *stress* conservadas no fígado larval do peixe zebra, incluindo a cascata de sinalização *redox* Krf2-Keap1; a biliatresona causa depleção transitória de GSH; os EHCs exibem um estado *redox* de GSH mais oxidado após a exposição à biliatresona quando comparado com os hepatócitos e IHCs; quando há depleção de GSH, os EHCs e IHCs resistentes são sensibilizados ao efeito tóxico da biliatresona; a reposição de GSH pela administração de N-acetilcisteína ou ativação de Nrf2 atenua a toxicidade induzida pela biliatresona. Perante os dados, a biliatresona ativa as vias de resposta ao *stress redox* hepático e a toxicidade seletiva pode ser explicada pelo gradiente reserva que existe entre os diferentes tipos de células hepáticas [50].

Contudo, se as mães não consomem biliatresona, poderão outras isoflavonas provocar a doença?

Efetivamente, os achados sugerem que a exposição a compostos de estrutura semelhante à biliatresona em alimentos ou outras fontes ambientais poderá ser um fator importante na patofisiologia da atresia biliar. Para além disso, as espécies de *Clostridium* encontradas na microbiota intestinal clivam isoflavonóides encontrados em produtos de soja amplamente consumidos, e produzem um metabolito semelhante à estrutura da porção eletrofílica da biliatresona. Isto levanta a possibilidade de as bactérias intestinais humanas poderem produzir toxinas semelhantes à biliatresona pela modificação de precursores não tóxicos, como é o caso da betavulgarina, encontrada na beterraba e nas acelgas [49].

4.1.2. Estrogénios

Os estrogénios são hormonas não apenas essenciais para o sistema reprodutor feminino, mas também controlam funções essenciais no sistema cardiovascular, ossos, cérebro e fígado. O conhecimento científico sobre os estrogénios intensificou-se nas últimas décadas, aquando da identificação dos subtipos de recetores de estrogénios (ER). No que diz respeito à atividade dos estrogénios no fígado, recentemente foi identificada a influência do estrogénio na árvore biliar, onde modulam a atividade dos colangiócitos. Os estrogénios atuam em ambos os subtipos de recetores de estrogénio (ER- α) e (ER- β) podendo ativar uma via direta (genómica), na qual o induz diretamente a maquinaria transcricional no

núcleo, e uma via indireta (não genômica) na qual a cascata de interações proteína-proteína com diferentes fatores de transcrição é ativada, assim os estrogénios desempenham um papel chave no ciclo complexo de fatores de crescimento e citocinas, que estimulam e modulam a resposta proliferativa dos colangiócitos aos danos [55], [56].

Por exemplo no útero, os estrogénios modulam a proliferação ativando uma série de fosforilações na cascata de sinalização Ras/Raf/proteínas quinase ativadas por mitogénio (MAPK). Esta cascata é ativada por fatores de crescimento que atuam através dos recetores tirosina quinase. O Src (*steroid receptor-coactivator*) e o Shc (*adapter protein Src-homology/collagen protein*) tem um papel importante através da ativação das isoformas MAPK quinase reguladas por sinal extracelular (ERK)_{1/2} (*extracelular regulated kinases*). A relação estrogénios/fatores de crescimento e se considerarmos o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1, podemos ter uma estimulação de crescimento sinérgica [56].

Efetivamente, um estudo que se propôs a estudar a influência dos estrogénios nos colangiócitos *in vivo* e *in vitro*, demonstra que a proliferação de colangiócitos induzida pela ligação do ducto biliar está associada à expressão aumentada da proteína do total e p-ERK_{1/2}, e da proteína adaptadora Shc em colangiócitos, para além disso, a inibição da proliferação de colangiócitos, pela administração de antagonistas ER, como o tamoxifeno, induz a diminuição na expressão proteica de ERK e Shc. É ainda referida a proliferação de colangiócitos *in vitro* pelo 17 β -estradiol associada a uma expressão aumentada de p-ERK_{1/2}, Src e Shc. Por outro lado, a proliferação dos colangiócitos induzida pelo 17 β -estradiol é inibida pelos antagonistas ER e inibidores de MEK (*mitogen-activated/extracellular-signal regulated protein kinase*) e Src. Todos os achados mencionados sugerem que o efeito estimulador dos estrogénios na proliferação dos colangiócitos envolve a cascata de sinalização Src-/Shc-/ERK-. Assim, a via ER/Src/Shc/ERK é ativada pelos estrogénios e é relevante para a proliferação dos colangiócitos [56].

A genisteína é um fitoestrogénio encontrando em produtos de soja, amplamente consumidos atualmente, devido às suas propriedades antioxidantes. No entanto, alguns estudos relatam que a ingestão de genisteína no período pré-natal pode resultar em efeitos duradouros na descendência, devido à capacidade da genisteína para acumular no feto. Devido à semelhança estrutural da genisteína com o 17 β -estradiol, podem-lhe ser atribuídas as mesmas propriedades anteriormente referidas para o 17 β -estradiol [57].

Num estudo realizado em ratos, para descobrir se a genisteína deixa assinaturas transcriptômicas/epigenéticas permanentes nas células hematopoiéticas, foi comparada a metilação do DNA de elementos repetitivos e os perfis de expressão génica em células hematopoiéticas de ratos expostos em período pré-natal à genisteína, com os grupos de controlo na idade adulta. Para além disso, foi avaliado o estado de metilação e o desenvolvimento do sangue fetal para entender os efeitos diretos da suplementação com genisteína. Os resultados mostraram que a exposição pré-natal à genisteína se associa à hipermetilação de certos elementos repetitivos ricos em CpG, que coincide com a regulação negativa significativa de genes responsivos ao estrogénio e genes envolvidos na hematopoiese em células da medula óssea de ratos expostos a genisteína. A exposição à genisteína apesar de não afetar diretamente a metilação global do fígado fetal, acelerou a mudança da linhagem eritróide primitiva para a definitiva [57].

Efetivamente, no estudo referido anteriormente os ratos são expostos a ~0.8mg de genisteína por dia, quantidade muito inferior às quantidades ingeridas por humanos diariamente. Um adulto que consome quantidades modestas de produtos com soja, perfaz um consumo diário de 1 a 9 mg de isoflavonas. Enquanto que nos países asiáticos a média de consumo diário é de 20 a 240 mg de isoflavonas, devido ao grande consumo de soja. É importante referir que os países asiáticos possuem uma maior prevalência de casos de AVB, sem saber o motivo, como referido na secção 1.6. [57].

Assim, sabendo que o metabolismo dos fitoesteróides é diferente no feto, e que o sangue do cordão umbilical possui um nível mais elevado de genisteína permitindo que esta se acumule no feto é de extrema importância esclarecer de que forma a exposição fetal aos derivados da soja é segura, efetuando estudos clínicos [57].

4.2. Hipóxia

A resposta do fígado à lesão traduz-se na produção de mediadores solúveis (mediadores pró-fibróticos), como fatores de crescimento para facilitar a reparação hepática, sendo este processo essencial para restaurar a homeostase hepática após lesão aguda. Contudo, quando há lesão crónica a ativação persistente destas vias promove processos patológicos, como a fibrose. A fibrose é caracterizada pela deposição de matriz celular excessiva no fígado durante a lesão crónica [58], [59].

Efetivamente, a fibrose hepática é iniciada quando a lesão estimula as células a produzirem os mediadores pro-fibróticos, como os fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformador (TGF)- β que estimulam células no fígado,

como as células estreladas, fibroblastos portais, hepatócitos e células epiteliais do ducto biliar para se diferenciarem em miofibroblastos. Além disso, são libertados mediadores que vão estimular a quimiotaxia dos miofibroblastos para as regiões de lesão e os estimulam a produzir colagénio, componente principal da fibrose. Os macrófagos hepáticos são uma fonte de mediadores pró-fibróticos, importante durante o desenvolvimento da fibrose, expressando também PDGF e TGF- β [58], [60].

Estudos revelam que o dano hepatocelular causa o desenvolvimento de regiões de hipóxia no fígado, em modelos animais de fibrose hepática. A hipóxia pode então ser um importante estimulador da produção de mediadores pró-fibróticos por macrófagos e outros tipos de células, ativando assim os fatores induzíveis por hipóxia (HIFs). Os HIFs são fatores de transcrição ativados em células hipóxicas. O fator de transcrição HIF funcional é composto por uma subunidade α , HIF-1 α ou HIF-2 α , e uma subunidade β , HIF-1 β . Quando as células ficam hipóxicas, as subunidades da proteína estabilizam e são translocadas para o núcleo, onde heterodimerizam com HIF-1 β e regulam a expressão de genes envolvidos na glicólise, angiogénese, metabolismo do ferro, controlo de pH, entre outras funções. Muitos dos genes que os HIFs estão envolvidos na patogénese da fibrose hepática [58], [59].

A hipóxia estimula as células de Kupffer a produzir PDGF-B (o estimulador mais potente da ativação das células estreladas hepáticas) e isto requer sinalização por parte de HIF, sugerindo que durante a fibrose, as células de Kupffer que se acumulam nas regiões do fígado com lesão, são tipicamente hipóxicas, podem ser estimuladas a produzir PDFG-B de uma forma dependente de HIF. A hipóxia também estimula as células de Kupffer à produção de mediadores pró-angiogénicos de forma dependente de HIF, importantes para o para o desenvolvimento de fibrose, pela estimulação das células estreladas hepáticas e quimiotaxia. Os mediadores pro-angiogénese, VEGF e Ang-1 são regulados positivamente nas células de Kupffer e encontram-se aumentados de maneira dependente de HIF. Tanto VEGF como Ang-1 são genes alvo para HIF, e ambos os mediadores estimulam a quimiotaxia das células estreladas hepáticas. Para além disso, durante o desenvolvimento da fibrose as células de Kupffer podem produzir MCP-1 de forma dependente de HIF, estimulam a quimiotaxia nas células estreladas hepáticas e recrutamento de monócitos adicionais em áreas lesadas onde ocorre fibrose [58].

Um estudo efetuado em células mielóides demonstra que HIF-1 β e HIF-1 α contribuem para o desenvolvimento de fibrose em células mielóides após ligação do ducto biliar. Os macrófagos hepáticos expressam PDGF-B no fígado durante lesão crónica, contudo o mecanismo pelo qual a lesão crónica aumenta expressão de PDGF-B permanece

desconhecido. Durante a lesão crónica induzida pela colestase, macrófagos hepáticos acumulam-se nas regiões hipóxicas do fígado, onde a hipóxia estimula a ativação do HIF-1 α , que heterodimeriza com o HIF-1 β e regula a produção de PDGF-B, o que promove a fibrose. Assim, este estudo confirma ainda a informação já referida relativamente aos mediadores pró-angiogénese e deixa ainda a sugestão da possibilidade do direcionamento terapêutico de HIF-1 α para prevenir a progressão da fibrose hepática [59].

Por último, um estudo que se propõe a avaliar o papel da arteriopatía como fator etiológico na AVB, avaliou a expressão génica do HIF1 α e HIF2 α , fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA) e os seus recetores VEGFR1 e VEGFR2, em fígados de bebés com AVB isolada. O estudo, para além de corroborar os aspetos anteriormente referidos, acrescenta que a hipoxia local pode resultar em isquemia secundária ao bloqueio do suprimento sanguíneo, causando a privação de oxigénio necessário ao metabolismo celular. Para além disso é confirmado que o espessamento medial da artéria hepática está presente em doentes com AVB e é indicativo de arteriopatía [61].

A angiogénese e a expressão de fatores vasculares, como VEGF, estão intimamente envolvidas na patogénese das doenças do trato biliar. Mas, são necessários mais estudos para abordar o papel que o VEGF desempenha na angiogénese aberrante durante a fibrose biliar e como os colangiócitos interagem com outros tipos de células hepáticas, por exemplo, com as HSC e células endoteliais vasculares. Estudos comprovam que existe uma maior expressão do VEGF-A nas estruturas portais em tecidos hepáticos de doentes com AVB, relativamente aos não-AVB. Além de participar na angiogénese, o VEGF-A atua na cicatrização de feridas, tumores, artrite reumatóide, retinopatía isquémica, psoríase, aterosclerose, entre outros. VEGF-A é o principal fator angiogénico induzida pela hipoxia, contudo a sua atividade também pode ser induzida em situações como hipoglicemia, acidose e inflamação. Atualmente, para o tratamento de doenças hepáticas crónicas são propostas terapias angiogénicas para modular a atividade do VEGF-A e dos seus recetores [62], [63].

Assim, podemos inferir que a AVB possui uma etiologia complexa e nos próximos capítulos serão apresentados novas perspetivas que sustentam esta afirmação.

5. Metilação do DNA

A metilação do DNA, tal como referido anteriormente, é um tipo de alteração epigenética, onde há uma modificação de resíduos de citosina no genoma, devido à adição de um grupo metil aos nucleósidos a citosina. Este processo é o único processo de modificação do DNA geneticamente programado em mamíferos, envolvido na regulação de vários processos biológicos, incluindo a transcrição dos genes, inativação do cromossoma X, *imprinting* genómico e modificações da cromatina. É importante referir que as mudanças na metilação do DNA podem ser induzidas por vários agentes, incluindo vírus e fatores ambientais, e isto sugere que a metilação alterada do DNA pode ser uma característica patogénica importante na AVB, independentemente da sua causa proximal. As potenciais causas de AVB, como químicos, toxinas, vírus e defeitos genéticos, podem induzir alterações no padrão de metilação do DNA e pode haver efeitos diferenciais de fatores ambientais em diferentes origens epigenéticas. Para além disso, as alterações epigenéticas da metilação do DNA podem demonstrar herança não-mendeliana, esclarecendo os casos familiares ocasionais e a não concordância entre gémeos monozigóticos [48], [64]–[66].

Efetivamente, o estado de metilação do DNA não é estático e pode alterar-se durante a progressão da fibrose hepática. No início do desenvolvimento de fibrose, a hipometilação desempenha o papel principal, contudo durante a progressão da fibrose, a hipermetilação torna-se mais pronunciada [67].

Os padrões de metilação do DNA são estabelecidos e mantidos por metiltransferases do DNA (*DNMTs*), sendo *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3B*, as três enzimas conhecidas por terem atividade. *DNMT3a* e *DNMT3b* são responsáveis por metilação *de novo* e modificar os DNA não metilado. O *DNMT1* age sob o DNA hemimetilado, contribuindo para manter os padrões de metilação. Para além disso o DNA metilado é ainda reconhecido por uma família de proteínas conservadas com domínio de ligação ao DNA (MBDs), que desempenham papéis ativos na regulação da metilação do DNA, formação da heterocromatina e na transcrição génica [66], [68].

A metilação do DNA desempenha um papel crítico na manutenção das funções das células T, e o crescimento corporal mostra a falha em manter os padrões de metilação do DNA em células T maduras, o que pode resultar em respostas autoimunes mediadas por células T *in vitro* e autoimunidade *in vivo* [66][69].

Num estudo em que se investigaram os níveis globais de metilação de DNA e os padrões de expressão de mRNA de DNMTs e genes MBDs, em células T CD4+ colhidas de bebês com AVB, identificaram um padrão aberrante de metilação de DNA, e expressão de DNMT e MB. Foi também verificado o aumento da expressão gênica de IFN- γ em células T CD4+ colhidas dos doentes pediátricos com AVB, dado que se correlaciona com o estado de metilação do DNA da região promotora do gene IFN- γ . O IFN- γ é fundamental para o desenvolvimento de respostas imunes inatas e adaptativas. Os estudos corroboram que a hipometilação do DNA leva à ativação de genes envolvidos na resposta inflamatória, como IFN- γ , sem evidência de inflamação celular [64], [66].

Alguns achados surgem isolados, como o aumento da metilação do promotor Foxp3 em células Treg (células T reguladoras imunossupressoras) pode levar à exacerbação da lesão inflamatória na AVB ou como as células T auxiliares Th1, Th2, T CD8+ e células NK desempenham uma função na lesão do ducto biliar na AVB. Porém são necessários mais estudos para confirmar estes achados e comprovar a sua evidência na patofisiologia da AVB [70], [71].

Os estudos sugerem que as causas da hipometilação associadas a diferentes doenças sejam associadas a alterações na atividade DNMT, modificações de histonas, insultos exógenos (dieta, ambiente, infecção), RNAs não codificantes ou reparação defeituosa de DNA. Um facto curioso é que as causas de hipometilação são consistentes com as causas da AVB, sugerindo que a hipometilação pode ser um fator que contribua para o desenvolvimento da AVB [66], [68].

5.1. Autotaxina

A autotaxina (ATX) é uma glicoproteína excretada que pertence à família de enzimas ectonucleótido pirofosfatase/fosfodiesterase (ENPP). ATX exibe atividade de uma lisofosfolipase D que gera o mediador lipídico ácido lisofosfatídico (LPA) de lisofosfolipídios extracelulares predominantemente de lisofosfatidilcolina. Estudos sugerem a ligação entre o eixo ATX-LPA e a fibrose hepática, uma vez que o LPA induz a proliferação de células estreladas hepáticas (HSC), estimula a sua contração e inibe a apoptose. HSCs são conhecidas como células prototípicas pró-fibrogénicas no parênquima hepático. Logo após a transformação em miofibroblastos em resposta a uma lesão hepática, HSCs passam a produzir matrizes extracelulares abundantes e citocinas pró-fibrogénicas, como derivado de ATX-LPA. A acumulação excessiva de proteínas da matriz extracelular (ECM) define a fibrose hepática [72], [73].

O primeiro estudo a relatar dados sobre a regulação epigenética potencial do gene *ATX* mostra que CpGs específicos dentro do promotor do gene *ATX* estão hipometilados nos doentes com AVB, o que foi sustentado por níveis significativamente elevados de *ATX* expressão e um aumento correspondente nos níveis de proteína *ATX*. Além disso a hipometilação do promotor *ATX* correlaciona-se negativamente com a gravidade dos parâmetros clínicos e fibrose [72].

6. A complexidade da patofisiologia da Atresia Biliar - Suscetibilidade genética, fatores ambientais e outros achados

A Atresia Biliar não é uma doença de etiologia definida e por isso a investigação dos fatores que para ela contribuem é de extrema importância, contudo não existe um consenso para uma única causa exclusiva, mas os estudos indicam que poderá ser um resultado de suscetibilidade genética de um indivíduo, juntamente com fatores precipitantes ambientais. São vários os estudos incluídos que referem diferentes suscetibilidades genéticas, contudo os fatores ambientes são sempre referidos como ponto comum entre eles. Além disso, é referida a possibilidade da exposição a um fator exógeno durante o período perinatal, possa ativar o sistema imunitário de um indivíduo geneticamente predisposto, e induzir uma resposta imunológica incontrolável e provavelmente autolimitada, que se manifesta em fibrose hepática e atresia dos ductos biliares extra-hepáticos. Assim, é defendido que a atresia biliar resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais, e a vulnerabilidade imunogenética dos doentes é crítica para a inflamação progressiva e nos processos esclerosantes [74]–[77].

Tal como referido na introdução desta dissertação, taxas de incidência de AVB elevadas são encontradas em certas populações de diferentes países climas e contextos socioeconómicos, com por exemplo as taxas particularmente altas no leste asiático e Polinésia, incluindo agora a Nova Zelândia. Um caso único relatado na literatura, envolve a família Maori na Nova Zelândia, com 50 vezes da taxa de incidência da AVB. Apesar de ter sido realizado a sequenciação do exoma dos indivíduos afetados, os investigadores não identificam nenhuma variante genética plausível que justifique a elevada recorrência de AVB nesta família [78].

Efetivamente, são muitos os achados isolados que encontramos na literatura e que necessitam de esclarecimento e confirmação, muitos envolvem o papel dos ácidos biliares, as vias de sinalização, e até mesmo achados que podem servir de biomarcadores. Num estudo observacional retrospectivo, foi estudada a relação entre a prematuridade e tempo retardado para a cirurgia e as suas implicações no prognóstico, daqui foi concluído que os bebés prematuros têm resultados semelhantes aos bebés de termo, apesar do diagnóstico tardio e de apresentarem com maior frequência a forma congénita. Para além disso, a alta incidência de gémeos discordantes apoia a teoria de que modificações epigenéticas podem contribuir para a patogénese da AVB [79].

Koh et al. mostraram que variantes em genes do DNA mitocondrial codificador de proteínas (mtDNA) e ou genes no DNA nuclear (nDNA) codificantes para componentes das mitocôndrias estão associadas à disfunção hepatocelular. O mtDNA humano é encontrado na matriz mitocondrial e consiste em 13 genes estruturais que codificam subunidades integrais da membrana para os complexos I, III, IV e V na cadeia respiratória mitocondrial. A matriz mitocondrial possui um sistema de reparação do mtDNA incompleto e é altamente sensível à lesão oxidativa induzida por ROS devido à sua proximidade com a membrana mitocondrial interna, onde a maioria das ROS são produzidas. Além disso, as mitocôndrias não funcionais são importantes para a produção de ROS, que por sua vez podem promover o aparecimento de apoptose e são responsáveis pela ativação de mecanismos pro-fibrogênicos. Portanto, alterações mitocondriais podem estar subjacentes aos mecanismos patológicos associados à AVB [80].

Relativamente à lesão oxidativa, já foi referido o mecanismo de defesa da GSH, contudo, este não é a única defesa existente. Os ácidos biliares são moléculas que sinalizam e controlam criticamente a função hepatocelular, quando existe interrupção da homeostase dos ácidos biliares pode implicar patogénese de doenças hepáticas crónicas. O aminoácido cisteína, suporta várias vias celulares importantes, como a síntese de proteínas, síntese de GSH, síntese de taurina e produção de sulfato, contudo quando demasiado elevada pode causar *stress* oxidativo e citotoxicidade. Os ácidos biliares possuem função fisiológica na regulação do metabolismo do aminoácido cisteína. A alteração da homeostase e sinalização do ácido biliar hepático pode modular a sensibilidade do fígado à lesão oxidativa. Estudos referem que a colestase resulta em mudanças adaptativas no fígado na tentativa de prevenir lesões hepáticas causadas pela acumulação de ácidos biliares. Além das propriedades de emulsão, os ácidos biliares funcionam como moléculas de sinalização para mediar as vias reguladoras que controlam quase todos os aspetos do seu metabolismo, tanto em condições normais quanto fisiopatológicas. No fígado colestático, os transportadores de ácidos biliares são alterados. Além disso, o fator de crescimento de fibroblastos 19 (FGF19) é produzido no intestino delgado e está envolvido na supressão da síntese hepática de ácido biliar, e o mesmo apresenta-se elevado na AVB [81]–[83].

Um achado interessante encontrado na literatura relaciona o colesterol e colestase, defendendo que os doentes com sobrecarga hepática de colesterol podem ser mais em risco de desenvolver complicações clínicas associadas com colestase. O colesterol do fígado prejudica a reparação do mesmo durante a obstrução colestática e agrava a doença com consequências fatais precoces [84].

Existe uma necessidade urgente de um diagnóstico melhorado e o mais precoce possível, por isso alguns estudos isolados relatam achados que podem servir de recurso no diagnóstico precoce da AVB. Exemplos disso são a deposição de péptido beta-amilóide em volta dos ductos biliares, encontrado em biópsias do fígado de doentes com AVB [85]. Também o perfil do metabolismo dos aminoácidos (ácido glutâmico, ornitina, isoleucina, lisina, valina, triptofano e serina) é referido na literatura com grande potencial para a diferenciação da AVB. Além disso, a expressão reduzida de Hnf1 β e da proteína Foxa2 na AVB também foi referida como possível fator e diagnóstico e distinção entre outras causas de Colestase Neonatal e AVB [85]–[87].

A hepcidina é um regulador crucial da homeostase do ferro e um mediador da inflamação crónica. A expressão da hepcidina está diminuída nos estágios iniciais da AVB e afirma-se como um regulador do metabolismo do ferro e na inflamação crónica observada na AVB [88].

Ao longo do texto foram referidas vias de sinalização e implicações das mesmas na patologia, contudo existem ainda outras referências na literatura a casos isolados, como é o caso da sinalização Notch, uma cascata de sinalização célula a célula evolutivamente conservada que é crítica para o desenvolvimento e reparação biliar pela indução da diferenciação das células progenitoras hepáticas (HPC) no epitélio biliar. Nos doentes de AVB há um aumento da ativação da via Notch. A ativação da via Hedgehog (HH) também é referida, e promove a expansão das populações de células epiteliais imaturas que co-expressam marcadores mesenquimais e podem ser pró-fibrogénicas. A AVB é caracterizada pela atividade excessiva da via HH, que estimula EMT biliar e pode contribuir para a dismorfogénese biliar. Sendo que as outras doenças colestáticas mostram ativação semelhante, esta é uma resposta comum à lesão colestática da infância. Além disso, estudos referem que TGF- β cruzou com várias outras vias de desenvolvimento, como Hedgehog, Wnt e as vias da proteína quinase ativada por mitogénio (MAPK), e cada via exhibe mudanças na expressão génica ao longo dos processos de desenvolvimento. A via de sinalização Wnt atua principalmente durante o desenvolvimento embrionário. [60], [89]–[92]

Por fim, resta referir outros achados isolados na literatura definida para esta dissertação, como a influência potencial do microbioma intestinal na AVB, onde a colonização potencial com espécies bacterianas predominantes é apontada como um fator importante para complicações infecciosas e/ou para a progressão da inflamação do fígado a cirrose em estágio terminal em crianças com AVB [93].

A atresia biliar apresenta maior associação com anomalias cardíacas congénitas do que a população geral hospitalizada, e é semelhante à associação entre anomalias cardíacas e cistos de colédoco. Além disso, a hipertensão portal (HP) aparece como uma resposta ao aumento da fibrose intra-hepática e manifesta-se clinicamente por ascites; esplenomegalia; e, com o tempo, formação de varizes esofágicas. Também os genes associados às ciliopatias foram avaliados e o PKD1L1 destacou-se como gene candidato etiológico para BASM [94]–[96].

Em suma, como podemos ver ao longo destes capítulos, a patofisiologia da Atresia Biliar é complexa e repleta de nuances, e os fatores epigenéticos e ambientais assumem um papel importante, não apenas da patogénese, mas também no diagnóstico precoce da doença.

Referências bibliográficas

- [1] H. Dancygier, *Clinical Hepatology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010.
- [2] K. E. McKay Bounford, “Investigations into the genetic causes of liver disease using molecular genetic technologies,” 2016.
- [3] J. S. Dooley, A. S. F. Lok, A. K. Burroughs, and E. J. Heathcote, Eds., *Sherlock’s Diseases of the Liver and Biliary System*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2011.
- [4] O. Ohtani and Y. Ohtani, “Lymph circulation in the liver,” *Anat. Rec.*, vol. 291, no. 6, pp. 643–652, 2008, doi: 10.1002/ar.20681.
- [5] C. B. Collares, S. Arana, and C. P. de F. Carvalho, “Histologia do Fígado, Vias Biliares e Pâncreas,” in *Sistema Digestório: Integração Básico-Clinica*, 2016, pp. 335–368.
- [6] J. Hall, *Guyton and Hall: Textbook of Medical Physiology*, 12th ed. Elsevier, 2011.
- [7] K. E. Barrett, S. Boitano, S. M. Barman, and H. L. Brooks, “Overview of Gastrointestinal Function & Regulation,” *Ganong’s Rev. Med. Physiol.*, no. 2010, pp. 1–34, 2012, [Online]. Available: <http://accesspharmacy.mhmedical.com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr:2048/content.aspx?bookid=393§ionid=39736769&jumpsectionID=39740022&Resultclick=2>.
- [8] J. L. dos Santos, E. Carvalho, and R. Seixas, “Coolestase neonatal,” in *Nascer e Crescer*, vol. 11, no. 3, 2011, pp. 225–268.
- [9] R. Fawaz *et al.*, “Guideline for the evaluation of cholestatic jaundice in infants: Joint recommendations of the North American society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition and the European society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutriti,” *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 64, no. 1, pp. 154–168, 2017, doi: 10.1097/MPG.0000000000001334.
- [10] E. S. Silva, I. Pó, and I. Gonçalves, “Coolestase neonatal - Protocolo de abordagem diagnóstica,” *Acta Pediátrica Port.*, vol. 41, no. 3, pp. 141–143, 2010.
- [11] E. Carvalho and J. Santos, “PRONAP - Ciclo XV,” *Fundação Sociedade Brasileira de Pediatria*, pp. 58–89, 2012.
- [12] R. K. Moreira, R. Cabral, R. A. Cowles, and S. J. Lobritto, “Biliary atresia: a multidisciplinary approach to diagnosis and management,” *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 136, no. 7, pp. 746–60, Jul. 2012, doi: 10.5858/arpa.2011-0623-RA.
- [13] M. Davenport, “Biliary atresia: Clinical aspects,” *Semin. Pediatr. Surg.*, vol. 21, no. 3, pp. 175–184, 2012, doi: 10.1053/j.sempedsurg.2012.05.010.
- [14] L. R. Silva, C. T. Ferreira, and E. de Carvalho, “Manual de Residência em Gastroenterologia Pediátrica,” p. 856, 2018.

- [15] S. Harpavat *et al.*, “Diagnostic Yield of Newborn Screening for Biliary Atresia Using Direct or Conjugated Bilirubin Measurements.,” *JAMA*, vol. 323, no. 12, pp. 1141–1150, Mar. 2020, doi: 10.1001/jama.2020.0837.
- [16] S. Niciura and N. Saraiva, *Epigenética: Bases Moleculares, Efeitos na Fisiologia e na Patologia e Implicações*, 2nd ed. Embrapa, 2015.
- [17] “O que é Epigenética?,” *Center on the Developing Child, Harvard University*, 2021. <https://developingchild.harvard.edu/translation/o-que-e-epigenetica/> (accessed Apr. 30, 2021).
- [18] N. Carey, *La Revolución Epigenética*. Biblioteca Buridán, 2011.
- [19] L. Zhang, Q. Lu, and C. Chang, “Epigenetics in Health and Disease,” in *Epigenetics in Allergy and Autoimmunity*, Springer, 2020, pp. 3–55.
- [20] A. C. Ferguson-Smith, J. M. Greally, and R. A. Martienssen, Eds., *Epigenomics*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009.
- [21] M. J. Bonder *et al.*, “Genetic and epigenetic regulation of gene expression in fetal and adult human livers,” *BMC Genomics*, vol. 15, no. 1, pp. 1–13, 2014, doi: 10.1186/1471-2164-15-860.
- [22] D. A. Mann, “Epigenetics in liver disease,” *Hepatology*, vol. 60, no. 4, pp. 1418–1425, 2014, doi: 10.1002/hep.27131.
- [23] T. Hardy and D. A. Mann, “Epigenetics in liver disease: From biology to therapeutics,” *Gut*, vol. 65, no. 11, pp. 1895–1905, 2016, doi: 10.1136/gutjnl-2015-311292.
- [24] N. Balasubramanian, M. W. Devereaux, D. J. Orlicky, R. J. Sokol, and F. J. Suchy, “Up-regulation of miR-let7a-5p Leads to Decreased Expression of ABCC2 in Obstructive Cholestasis.,” *Hepatol. Commun.*, vol. 3, no. 12, pp. 1674–1686, Dec. 2019, doi: 10.1002/hep4.1433.
- [25] M. Smith, M. Zuckerman, A. Kandaneeratchi, R. Thompson, and M. Davenport, “Using next-generation sequencing of microRNAs to identify host and/or pathogen nucleic acid signatures in samples from children with biliary atresia – a pilot study,” *Access Microbiol.*, vol. 2, no. 7, Jul. 2020, doi: 10.1099/acmi.0.000127.
- [26] M. W. Azeltine *et al.*, “Inflammation Drives MicroRNAs to Limit Hepatocyte Bile Acid Transport in Murine Biliary Atresia,” *J. Surg. Res.*, vol. 256, pp. 663–672, Dec. 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2020.07.003>.
- [27] N. J. Hand *et al.*, “MicroRNA Profiling Identifies miR-29 as a Regulator of Disease-associated Pathways in Experimental Biliary Atresia,” *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 54, no. 2, pp. 186–192, Feb. 2012, doi: 10.1097/MPG.0b013e318244148b.

- [28] R. C. Friedman, K. K. H. Farh, C. B. Burge, and D. P. Bartel, "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs," *Genome Res.*, vol. 19, no. 1, pp. 92–105, 2009, doi: 10.1101/gr.082701.108.
- [29] A. M. Zahm, N. J. Hand, L. A. Boateng, and J. R. Friedman, "Circulating MicroRNA is a biomarker of biliary atresia," *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 55, no. 4, pp. 366–369, 2012, doi: 10.1097/MPG.0b013e318264e648.
- [30] X. Chen *et al.*, "Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases," *Cell Res.*, vol. 18, no. 10, pp. 997–1006, 2008, doi: 10.1038/cr.2008.282.
- [31] R. Dong, Z. Shen, C. Zheng, G. Chen, and S. Zheng, "Serum microRNA microarray analysis identifies miR-4429 and miR-4689 are potential diagnostic biomarkers for biliary atresia," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 21084, Aug. 2016, doi: 10.1038/srep21084.
- [32] S. Gilad *et al.*, "Serum microRNAs are promising novel biomarkers," *PLoS One*, vol. 3, no. 9, pp. 1–7, 2008, doi: 10.1371/journal.pone.0003148.
- [33] K. Bessho *et al.*, "Integrative genomics identifies candidate microRNAs for pathogenesis of experimental biliary atresia," *BMC Syst. Biol.*, vol. 7, p. 104, 2013, doi: 10.1186/1752-0509-7-104.
- [34] J. Wang *et al.*, "Suppressing microRNA-29c promotes biliary atresia-related fibrosis by targeting DNMT3A and DNMT3B," *Cell. Mol. Biol. Lett.*, vol. 24, no. 1, p. 10, Dec. 2019, doi: 10.1186/s11658-018-0134-9.
- [35] Y. Xiao *et al.*, "Up-regulation of miR-200b in biliary atresia patients accelerates proliferation and migration of hepatic stellate cells by activating PI3K/Akt signaling," *Cell. Signal.*, vol. 26, no. 5, pp. 925–932, 2014, doi: 10.1016/j.cellsig.2014.01.003.
- [36] I. Goldschmidt, T. Thum, and U. Baumann, "Circulating miR-21 and miR-29a as Markers of Disease Severity and Etiology in Cholestatic Pediatric Liver Disease," *J. Clin. Med.*, vol. 5, no. 3, Mar. 2016, doi: 10.3390/jcm5030028.
- [37] L. L. Kennedy *et al.*, "Knockout of microRNA-21 reduces biliary hyperplasia and liver fibrosis in cholestatic bile duct ligated mice," *Lab. Investig.*, vol. 96, no. 12, pp. 1256–1267, Dec. 2016, doi: 10.1038/labinvest.2016.112.
- [38] A. Makhmudi, A. S. Kalim, and Gunadi, "microRNA-21 expressions impact on liver fibrosis in biliary atresia patients," *BMC Res. Notes*, vol. 12, 2019, doi: 10.1186/s13104-019-4227-y.
- [39] W. Shen, G. Chen, R. Dong, R. Zhao, and S. Zheng, "MicroRNA-21/PTEN/Akt axis in the fibrogenesis of biliary atresia," *J. Pediatr. Surg.*, vol. 49, no. 12, pp. 1738–1741, 2014, doi: 10.1016/j.jpedsurg.2014.09.009.

- [40] Y. Ye *et al.*, “Downregulation of microRNA-145 may contribute to liver fibrosis in biliary atresia by targeting ADD3,” *PLoS One*, vol. 12, no. 9, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0180896.
- [41] X. Peng *et al.*, “Identification of circulating micrnas in biliary atresia by next-generation sequencing,” *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 63, no. 5, pp. 518–523, 2016, doi: 10.1097/MPG.0000000000001194.
- [42] Y. Yang *et al.*, “MicroRNA-29b/142-5p contribute to the pathogenesis of biliary atresia by regulating the IFN- γ gene,” *Cell Death Dis.*, vol. 9, no. 5, May 2018, doi: 10.1038/s41419-018-0605-y.
- [43] D. Zhao, Y. Luo, Y. Xia, J. J. Zhang, and Q. Xia, “MicroRNA-19b Expression in Human Biliary Atresia Specimens and Its Role in BA-Related Fibrosis,” *Dig. Dis. Sci.*, vol. 62, no. 3, pp. 689–698, 2017, doi: 10.1007/s10620-016-4411-z.
- [44] R. Zhao *et al.*, “MicroRNA-155 modulates bile duct inflammation by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 in biliary atresia,” *Pediatr. Res.*, vol. 82, no. 6, pp. 1007–1016, 2017, doi: 10.1038/pr.2017.87.
- [45] E. Gawish, E. A. El-Monem, M. El-Abd, G. A. Sobhy, and H. Ghanem, “MicroRNA-499 rs3746444 polymorphism in Egyptian children with biliary atresia,” *Clin. Exp. Hepatol.*, vol. 6, no. 3, pp. 263–269, 2020, doi: 10.5114/ceh.2020.99526.
- [46] A.-Y. Gong *et al.*, “MicroRNA-513 Regulates B7-H1 Translation and Is Involved in IFN- γ -Induced B7-H1 Expression in Cholangiocytes,” *J. Immunol.*, vol. 182, no. 3, pp. 1325–1333, 2009, doi: 10.4049/jimmunol.182.3.1325.
- [47] Y. Xiao *et al.*, “Long Noncoding RNA H19 Contributes to Cholangiocyte Proliferation and Cholestatic Liver Fibrosis in Biliary Atresia,” *Hepatology*, vol. 70, no. 5, pp. 1658–1673, Nov. 2019, doi: 10.1002/hep.30698.
- [48] W. Udomsinprasert, N. Kitkumthorn, A. Mutirangura, V. Chongsrisawat, Y. Poovorawan, and S. Honsawek, “Global methylation, oxidative stress, and relative telomere length in biliary atresia patients,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. May, pp. 1–11, 2016, doi: 10.1038/srep26969.
- [49] K. Lorent *et al.*, “Identification of a plant isoflavonoid that causes biliary atresia,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 7, no. 286, pp. 1–12, 2015, doi: 10.1126/scitranslmed.aaa1652.
- [50] X. Zhao *et al.*, “Glutathione antioxidant pathway activity and reserve determine toxicity and specificity of the biliary toxin biliatresone in zebrafish,” *Hepatology*, vol. 64, no. 3, pp. 894–907, 2016, doi: 10.1002/hep.28603.
- [51] O. Waisbourd-Zinman *et al.*, “The toxin biliatresone causes mouse extrahepatic cholangiocyte damage and fibrosis through decreased glutathione and SOX17,” *Hepatology*, vol. 64, no. 3, pp. 880–893, 2016, doi: 10.1002/hep.28599.

- [52] X. Zhao *et al.*, “Impaired Redox and Protein Homeostasis as Risk Factors and Therapeutic Targets in Toxin-Induced Biliary Atresia,” *Gastroenterology*, vol. 159, no. 3, pp. 1068–1084.e2, 2020, doi: 10.1053/j.gastro.2020.05.080.
- [53] M. Uemura *et al.*, “Sox17 haploinsufficiency results in perinatal biliary atresia and hepatitis in C57BL/6 background mice.,” *Development*, vol. 140, no. 3, pp. 639–648, Feb. 2013, doi: 10.1242/dev.086702.
- [54] H. Higashiyama *et al.*, “Embryonic cholecystitis and defective gallbladder contraction in the Sox17-haploinsufficient mouse model of biliary atresia.,” *Development*, vol. 144, no. 10, pp. 1906–1917, May 2017, doi: 10.1242/dev.147512.
- [55] D. Alvaro *et al.*, “Estrogens and the pathophysiology of the biliary tree.,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 12, no. 22, pp. 3537–3545, Jun. 2006, doi: 10.3748/wjg.v12.i22.3537.
- [56] D. Alvaro *et al.*, “Intracellular Pathways Mediating Estrogen-Induced Cholangiocyte Proliferation in the Rat,” no. 1, pp. 297–304, doi: 10.1053/jhep.2002.34741.
- [57] K. Vanhees, S. Coort, E. J. B. Ruijters, R. W. L. Godschalk, F. J. Schooten, and S. B. van W. Doorn-Khosrovani, “Epigenetics: prenatal exposure to genistein leaves a permanent signature on the hematopoietic lineage,” *FASEB J.*, vol. 25, no. 2, pp. 797–807, 2011, doi: 10.1096/fj.10-172155.
- [58] B. L. Copple, S. Bai, and J. O. Moon, “Hypoxia-inducible factor-dependent production of profibrotic mediators by hypoxic Kupffer cells,” *Hepatol. Res.*, vol. 40, no. 5, pp. 530–539, 2010, doi: 10.1111/j.1872-034X.2010.00635.x.
- [59] B. L. Copple, S. Kaska, and C. Wentling, “Hypoxia-Inducible Factor Activation in Myeloid Cells Contributes to the Development of Liver Fibrosis in Cholestatic Mice.,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 341, no. 2, pp. 307–316, May 2012, doi: 10.1124/jpet.111.189340.
- [60] Y. Chung-Davidson *et al.*, “TGF- β Signaling Plays a Pivotal Role During Developmental Biliary Atresia in Sea Lamprey (*Petromyzon marinus*),” *Hepatol. Commun.*, vol. 4, no. 2, pp. 219–234, Feb. 2020, doi: 10.1002/hep4.1461.
- [61] L. X. S. Fratta *et al.*, “Hypoxic-ischemic gene expression profile in the isolated variant of biliary atresia,” *J. Hepatobiliary. Pancreat. Sci.*, vol. 22, no. 12, pp. 846–854, 2015, doi: 10.1002/jhbp.297.
- [62] A. Allam *et al.*, “Expression of vascular endothelial growth factor A in liver tissues of infants with biliary atresia.,” *Clin. Exp. Hepatol.*, vol. 5, no. 4, pp. 308–316, Nov. 2019, doi: 10.5114/ceh.2019.89476.

- [63] P. T. Edom, L. Meurer, T. R. Da Silveira, U. Matte, and J. L. Dos Santos, "Immunolocalization of VEGF A and its receptors, VEGFR1 and VEGFR2, in the liver from patients with biliary atresia," *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, vol. 19, no. 4, pp. 360–368, Jul. 2011, doi: 10.1097/PAI.ob013e3182028a8e.
- [64] R. P. Matthews *et al.*, "DNA hypomethylation causes bile duct defects in zebrafish and is a distinguishing feature of infantile biliary atresia," *Hepatology*, vol. 53, no. 3, pp. 905–914, 2011, doi: 10.1002/hep.24106.
- [65] Z. C. Cofer *et al.*, "Methylation Microarray Studies Highlight PDGFA Expression as a Factor in Biliary Atresia," *PLoS One*, vol. 11, no. 3, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0151521.
- [66] R. Dong, R. Zhao, and S. Zheng, "Changes in epigenetic regulation of CD4+ T lymphocytes in biliary atresia," *Pediatr. Res.*, vol. 70, no. 6, pp. 555–559, 2011, doi: 10.1203/PDR.ob013e318232a949.
- [67] Y. Komatsu, T. Waku, N. Iwasaki, W. Ono, C. Yamaguchi, and J. Yanagisawa, "Global analysis of DNA methylation in early-stage liver fibrosis.," *BMC Med. Genomics*, vol. 5, p. 5, 2012, doi: 10.1186/1755-8794-5-5.
- [68] P. P. Lee *et al.*, "A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival," *Immunity*, vol. 15, no. 5, pp. 763–774, 2001, doi: 10.1016/S1074-7613(01)00227-8.
- [69] R. Dong, R. Zhao, S. Zheng, Y. Zheng, S. Xiong, and Y. Chu, "Abnormal dna methylation of itgal (cd11a) in cd4+ t cells from infants with biliary atresia," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 417, no. 3, pp. 986–990, 2012, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.054.
- [70] K. Li *et al.*, "Foxp3 promoter methylation impairs suppressive function of regulatory T cells in biliary atresia," *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 311, no. 6, pp. G989–G997, 2016, doi: 10.1152/ajpgi.00032.2016.
- [71] J. Li *et al.*, "Th2 signals induce epithelial injury in mice and are compatible with the biliary atresia phenotype.," *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 11, pp. 4244–4256, Nov. 2011, doi: 10.1172/JCI57728.
- [72] W. Udomsinprasert, N. Kitkumthorn, A. Mutirangura, V. Chongsrisawat, Y. Poovorawan, and S. Honsawek, "Association between Promoter Hypomethylation and Overexpression of Autotaxin with Outcome Parameters in Biliary Atresia.," *PLoS One*, vol. 12, no. 1, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0169306.
- [73] W. Udomsinprasert, P. Vejchapipat, N. Klaikeaw, V. Chongsrisawat, Y. Poovorawan, and S. Honsawek, "Hepatic autotaxin overexpression in infants with biliary atresia.," *PeerJ*, vol. 6, 2018, doi: 10.7717/peerj.5224.

- [74] S. Cui *et al.*, “Evidence from human and zebrafish That GPC1 is a biliary atresia susceptibility gene,” *Gastroenterology*, vol. 144, no. 5, pp. 1107–1115.e3, May 2013, doi: 10.1053/j.gastro.2013.01.022.
- [75] R. Rajagopalan *et al.*, “Exome Sequencing in Individuals with Isolated Biliary Atresia.,” *Sci. Rep.*, vol. 10, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-59379-4.
- [76] M.-M. Garcia-Barceló *et al.*, “Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for biliary atresia on 10q24.2.,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 19, no. 14, pp. 2917–2925, Jul. 2010, doi: 10.1093/hmg/ddq196.
- [77] B. M. Smith, J. M. Laberge, R. Schreiber, A. M. Weber, and H. Blanchard, “Familial biliary atresia in three siblings including twins,” *J. Pediatr. Surg.*, vol. 26, no. 11, pp. 1331–1333, Nov. 1991, doi: 10.1016/0022-3468(91)90613-X.
- [78] S. R. Cameron-Christie *et al.*, “Genetic investigation into an increased susceptibility to biliary atresia in an extended New Zealand Māori family.,” *BMC Med. Genomics*, vol. 11, 2018, doi: 10.1186/s12920-018-0440-0.
- [79] N. Durkin, M. Deheragoda, and M. Davenport, “Prematurity and biliary atresia: a 30-year observational study,” *Pediatr. Surg. Int.*, vol. 33, no. 12, pp. 1355–1361, Dec. 2017, doi: 10.1007/s00383-017-4193-1.
- [80] H. Koh *et al.*, “Mitochondrial Mutations in Cholestatic Liver Disease with Biliary Atresia,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 905, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-017-18958-8.
- [81] Y. Wang *et al.*, “Bile acids regulate cysteine catabolism and glutathione regeneration to modulate hepatic sensitivity to oxidative injury,” *JCI Insight*, vol. 3, no. 8, Apr. 2018, doi: 10.1172/jci.insight.99676.
- [82] H. Johansson *et al.*, “Regulation of bile acid metabolism in biliary atresia: reduction of FGF19 by Kasai portoenterostomy and possible relation to early outcome,” *J. Intern. Med.*, vol. 287, no. 5, pp. 534–545, May 2020, doi: 10.1111/joim.13028.
- [83] S.-Y. Cai, D. A. Lionarons, L. Hagey, C. J. Soroka, A. Mennone, and J. L. Boyer, “Adult sea lamprey tolerates biliary atresia by altering bile salt composition and renal excretion.,” *Hepatology*, vol. 57, no. 6, pp. 2418–2426, Jun. 2013, doi: 10.1002/hep.26161.
- [84] N. Nuño-Lámbarki *et al.*, “Liver Cholesterol Overload Aggravates Obstructive Cholestasis by Inducing Oxidative Stress and Premature Death in Mice.,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/9895176.
- [85] R. O. Babu *et al.*, “Beta-amyloid deposition around hepatic bile ducts is a novel pathobiological and diagnostic feature of biliary atresia,” *J. Hepatol.*, vol. 73, no. 6, pp. 1391–1403, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.jhep.2020.06.012.

- [86] K. Zhou *et al.*, “Metabonomics Reveals Metabolite Changes in Biliary Atresia Infants,” *J. Proteome Res.*, vol. 14, no. 6, pp. 2569–2574, Jun. 2015, doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00125.
- [87] U. F. Shaalan, N. L. Ibrahim, N. A. Ehsan, M. M. Sultan, G. M. Naser, and M. O. Abd El-Fatah, “Reduced Immunohistochemical Expression of Hnf1 β and FoxA2 in Liver Tissue Can Discriminate between Biliary Atresia and Other Causes of Neonatal Cholestasis,” *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, vol. 27, no. 4, pp. E32–E38, Apr. 2019, doi: 10.1097/PAI.0000000000000638.
- [88] Y. H. Huang *et al.*, “Liver hepcidin and stainable iron expression in biliary atresia,” *Pediatr. Res.*, vol. 59, no. 5, pp. 662–666, May 2006, doi: 10.1203/01.pdr.0000214974.55049.f1.
- [89] A. Omenetti *et al.*, “Hedgehog Activity, Epithelial-Mesenchymal Transitions, and Biliary Dysmorphogenesis in Biliary Atresia,” *Hepatology*, vol. 53, no. 4, pp. 1246–1258, Apr. 2011, doi: 10.1002/hep.24156.
- [90] J. A. Zagory *et al.*, “Notch signaling promotes ductular reactions in biliary atresia,” *J. Surg. Res.*, vol. 215, no. 323, pp. 250–256, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.jss.2017.03.051.
- [91] M. Delous *et al.*, “sox9b Is a Key Regulator of Pancreaticobiliary Ductal System Development,” *PLoS Genet.*, vol. 8, no. 6, Jun. 2012, doi: 10.1371/journal.pgen.1002754.
- [92] S. Fried *et al.*, “Extrahepatic cholangiocyte obstruction is mediated by decreased glutathione, Wnt and Notch signaling pathways in a toxic model of biliary atresia,” *Sci. Rep.*, vol. 10, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-64503-5.
- [93] J. Jee, R. Mourya, P. Shivakumar, L. Fei, M. Wagner, and J. A. Bezerra, “Cxcr2 signaling and the microbiome suppress inflammation, bile duct injury, and the phenotype of experimental biliary atresia,” *PLoS One*, vol. 12, no. 8, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0182089.
- [94] A. J. Murphy, J. R. Axt, and H. N. Lovvorn, “Associations between pediatric choledochal cysts, biliary atresia, and congenital cardiac anomalies,” *J. Surg. Res.*, vol. 177, no. 2, pp. e59–e63, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.jss.2012.04.018.
- [95] A. Shalaby, E. Makin, and M. Davenport, “Portal venous pressure in biliary atresia,” *J. Pediatr. Surg.*, vol. 47, no. 2, pp. 363–366, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.jpedsurg.2011.11.031.
- [96] J. P. Berauer *et al.*, “Identification of Polycystic Kidney Disease 1 Like 1 Gene Variants in Children With Biliary Atresia Splenic Malformation Syndrome,” *Hepatology*, vol. 70, no. 3, pp. 899–910, Sep. 2019, doi: 10.1002/hep.30515.

Capítulo 2

1. Introdução

A atividade farmacêutica como arte de curar acompanha a própria evolução da humanidade. Apesar da origem da atividade apenas remontar ao século X, por meio de boticários, em boticas e apotecas, desde o paleolítico que os povos usavam plantas e substâncias de origem animal, com fins curativos. Até ao século XIII, a farmácia e a medicina eram uma só profissão e os boticários eram os responsáveis pelo tratamento e cura das doenças. Com a separação de médicos e farmacêuticos neste século, os primeiros ficaram encarregues do diagnóstico de doenças e aos farmacêuticos caberia a tarefa de manipulação dos medicamentos para tratamento e cura. O símbolo da farmácia tem a sua origem na mitologia grega, a taça entrelaçada por uma cobra, simboliza o poder da cura e prevalece igual séculos depois.

Enquanto o símbolo prevaleceu igual até aos dias de hoje, as boticas evoluíram até ao atual modelo de farmácia comunitária e um longo percurso de mudanças, obrigou a que os farmacêuticos, tal como a cobra, mudassem inúmeras vezes de pele para crescer e acompanhar a evolução dos tempos. Tal como consta do código deontológico da Ordem dos Farmacêuticos (OF), “o exercício da atividade farmacêutica tem como objetivo essencial a pessoa do doente” e o ato farmacêutico é de competência exclusiva do farmacêutico. Apesar do farmacêutico ser por excelência o especialista do medicamento, a atividade farmacêutica faz-se constituir de diferentes áreas de atuação, sendo a de maior visibilidade, pela importância que tem junto aos utentes, a Farmácia Comunitária.

Efetivamente, o farmacêutico não é apenas o especialista do medicamento, mas é sobretudo um agente de saúde pública e todos os dias nas farmácias comunitárias, apesar de estas serem um setor privado da saúde, os farmacêuticos prestam um serviço público à comunidade. O farmacêutico é o primeiro profissional a ser procurado pela sua proximidade à população, e é muitas vezes o último profissional a ter contacto com o utente aquando da dispensa de medicamentos, farmacovigilância e seguimento farmacoterapêutico, por isso as suas preocupações vão além do medicamento enquanto produto [97], [98].

Assim, por tudo o anteriormente referido, o estágio curricular em Farmácia Comunitária como conclusão do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas é o fecho com chave de ouro, porque me ensinou o verdadeiro sentido da palavra cuidar, e porque me permitiu contactar com os profissionais que estão lá por todos nós durante 24h por dia, 7 dias por

semana e 365 a 366 dias por ano prontos a ajudar, não só a tratar, mas a prevenir e preservar a saúde dos utentes. O meu estágio decorreu na Farmácia São João na Covilhã, entre os dias 1 de fevereiro e 11 de junho de 2021, com a orientação e supervisão da Dra. Dina Esteves.

2. Grupo Holon

O termo Holon vem do grego *holos*, que significa todo ou inteiro. O seu conceito descreve algo que é um todo em si mesmo e, simultaneamente, uma parte de um sistema maior. O Grupo Holon é por isso um reflexo de cada farmácia que o constituiu, e cada farmácia é um todo em si mesmo. Cada farmácia contribui para o todo e todas juntas formam um todo maior, com maior poder de resposta às necessidades dos utentes e da comunidade.

O grupo de Farmácias Holon partilha do mesmo objetivo, prestar um serviço focado no utente para a melhoria da sua qualidade de vida num todo. As farmácias do grupo partilham também o nome e imagem, e contam ainda com equipas dinâmicas e proativas. Para além disso, a formação dos profissionais é constante seja através de protocolos de aconselhamento, folhetos, manuais ou através da plataforma e-learning do grupo.

3. A Farmácia São João

A Farmácia São João (FSJ) abriu a 27 de maio de 1964, e labora nas mesmas instalações desde então, contudo a Farmácia deteve vários proprietários, sendo adquirida e remodelada pelo atual proprietário em outubro de 2019. Atualmente, a FSJ pertence ao grupo das Farmácias Holon, onde pertencem também a Farmácia Pedroso e a Farmácia Holon Covilhã, ambas situadas na Covilhã, e a Farmácia Diamantino, situada no Fundão.

3.1. Localização e Horário

A Farmácia São João localiza-se na rua Marquês de Ávila e Bolama 342, 6200-053 Covilhã, junto ao Supermercado Rei dos Preços e ao edifício das Garagens de São João.

O horário de atendimento é das 9h às 20h de segunda a sexta, e das 9h às 13h ao sábado, sendo que atualmente o serviço permanente, em que a farmácia realiza 24h de funcionamento, é assegurado pela Farmácia Holon Covilhã. Assim, de acordo com a Portaria nº277/2012 de 12 de setembro de 2012, a Farmácia São João cumpre com o período de funcionamento semanal mínimo das farmácias portuguesas.

Uma vez que a farmácia se localiza junto à zona mais antiga da Covilhã, a população que maioritariamente frequenta a farmácia é idosa e polimedicada, contudo em alguns dias da semana podem também frequentar a farmácia, adultos e adultos jovens. Para além disso, esporadicamente a FSJ também recebe alunos universitários portugueses e estrangeiros, o que muitas vezes implica comunicar em inglês.

3.2. Espaço exterior

A FSJ garante a acessibilidade à farmácia de todos os potenciais utentes, incluindo crianças, idosos e cidadãos portadores de deficiência, e possui um guarda-vento, que evita o contacto direto do utente com o exterior enquanto aguarda. A farmácia é facilmente visível pela inscrição “Farmácia São João”, acima de montra e na lateral do edifício onde se localiza, e pelo símbolo “cruz verde”, cuja configuração é definida pelo INFARMED, I.P. (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.).

Para além disso, a farmácia possui no exterior a identificação da Diretora Técnica, o horário de funcionamento, informação sobre os serviços prestados e a calendarização das farmácias de serviço permanente da semanal colocados de forma visível. Atualmente, existe também afixado o cartaz da linha 1400, que permite contactar com as farmácias após a hora de fecho da mesma e no caso de a farmácia estar destacada para o serviço permanente, o utente poderá deslocar-se à mesma para levantar receitas do próprio dia, ou do dia anterior, bem como para assistência farmacêutica urgente. A linha 1400 é gratuita e funciona 24h por dia, orientando sempre o utente para a farmácia da sua preferência que se encontre mais próxima e com capacidade de resposta ao pedido do utente. A FSJ possui uma fachada limpa e em boas condições de conservação. Por tudo o citado acima, a FSJ cumpre as Boas Práticas Farmacêuticas para a Farmácia Comunitária (BPF), e o artigo 28º do Decreto-Lei nº 307/2007, de 31 de agosto.

3.3. Espaço interior

A FSJ oferece no seu interior um ambiente profissional, calmo e organizado o que auxilia numa comunicação mais eficaz entre profissionais e utentes. A farmácia é bem iluminada, ventilada e limpa, com superfícies, armários e prateleiras em materiais adequados e laváveis [99].

As instalações da FSJ cumprem com o disposto no Anexo da Deliberação n.º 1502/2014, de 3 de julho no que respeita as áreas mínimas das farmácias e suas divisões. A farmácia possui uma área total mínima de 95 m² distribuída em dois pisos. No rés do chão dispõe de uma

área de atendimento ao público (> 50 m²), duas instalações sanitárias (>5 m²), uma área de receção de encomendas (>5 m²), uma área para armazenamento primário e um gabinete de atendimento personalizado. O piso inferior é constituído pelo escritório, armazém (>25 m²), uma área de copa e o laboratório (>8 m²) onde se encontra o servidor e a biblioteca [100].

Para além disso, é de salientar que todos os locais de armazenamento da FSJ, que serão apresentados nas secções seguintes, respeitam as exigências de iluminação temperatura, humidade e ventilação das zonas de armazenamento para os medicamentos e outros produtos farmacêuticos. Para garantir as condições, as mesmas são registadas periodicamente como será explicado mais adiante [99].

3.3.1. Área de atendimento ao público

A área de atendimento ao público da FSJ é composta por três balcões em pé e um balcão de atendimento sentado, separados fisicamente permitindo a privacidade do utente. Todos os balcões têm computador com o software *Sifarma2000*, impressora de etiquetas, impressora de receitas e faturação, leitor de código de barras e, no atual contexto da pandemia Covid-19, todos possuem um acrílico de proteção, garantindo assim todas as condições necessárias ao atendimento e aconselhamento mais seguro e eficaz. O balcão de atendimento sentado possui ainda uma impressora para impressão de cartões de cliente.

Nesta zona há também informação sobre os serviços prestados, livro de reclamações, um dispensador de álcool gel, o nome da diretora técnica, informação sobre o uso obrigatório de máscara, proibição de fumar e informação de atendimento prioritário. Para além disso, há uma balança que permite a determinação de peso, altura, índice de massa corporal (IMC), massa gorda, ritmo cardíaco e pressão arterial.

Os medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM), medicamentos de uso veterinário (MUV) e alguns suplementos alimentares encontram-se atrás dos três balcões de atendimento em pé. No espaço restante da área de atendimento ao público, encontramos diferentes secções com produtos de dermocosmética, saúde sexual, puericultura, higiene, produtos dietéticos, podologia e vários dispositivos médicos organizados em lineares de livre acesso ao utente. A organização dos produtos aqui expostos vai variando mensalmente e sazonalmente, sendo esta homogénea em todas as farmácias do grupo Holon. Mensalmente, existe uma secção temática na qual são expostos em categorias os produtos definidos para aquele mês. A reposição dos produtos é ativa para permitir a disponibilidade constante dos produtos durante o atendimento tornando-o mais fluído e efetivo.

Todos os farmacêuticos ou colaboradores que permaneçam na área de atendimento ao público encontram-se devidamente identificados mediante o uso de um cartão.

3.3.2. Áreas de receção de encomendas e armazenamento primário

A área de armazenamento primário pode ser acedida por duas passagens existentes na zona de atendimento, atrás dos balcões em pé. É nesta zona que a maioria dos medicamentos são armazenados em armários com gavetas ou prateleiras.

Efetivamente, existem 2 armários com gavetas e 5 armários com prateleiras. No primeiro armário de gavetas é onde encontramos os medicamentos organizados por ordem alfabética, independentemente da forma farmacêutica, à exceção das gavetas do fundo onde encontramos apenas saquetas, soluções orais, ampolas, lancetas, tiras de glicémia e dispositivos médicos. No segundo armário de gavetas, encontramos seringas, pensos, ligaduras, compressas, kits de troca de seringas, vaselina, ponteiras de bengalas e canadianas. Três dos armários com prateleiras estão mais próximos da zona de atendimento e contêm os medicamentos com grande rotatividade para permitir o seu acesso fácil durante o atendimento. Próximo destes armários encontramos um quarto armário com prateleiras, onde estão os produtos com validade a terminar no topo e no fundo do armário encontramos emplastos, soros e produtos de desinfeção. O quinto armário com prateleiras destina-se a produtos de aplicação tópica (cremes, pomadas, emulsões, loções) e a produtos de uso retal e vaginal. Por último, o sexto armário sem gavetas permite a organização dos produtos reservados, em reservas pagas e não pagas pelo nº de série. Todos os produtos que não seja possível arrumar nos locais anteriormente referidos, serão armazenados no armazém do piso inferior, até haver necessidade de reposição na área de armazenamento primário. Para além disso, a zona de armazenamento primário permite o acesso a um WC, ao piso inferior, gabinete de atendimento personalizado e à área de receção das encomendas.

A área de receção de encomendas faz-se constituir por computador com o software *Sifarma2000*, leitor ótico de códigos de barras, impressora de etiquetas, telefone, frigorífico com termohigrómetro para armazenamento dos medicamentos termolábeis, armário para arrumação de faturas e notas de devolução, gavetas para colocar os medicamentos rececionados, que posteriormente são arrumados no armazém primário. Para além disso, existe uma máquina para a contagem do dinheiro das caixas ao final do dia e acesso ao outro WC.

3.3.3. Gabinete de atendimento personalizado

O gabinete de atendimento personalizado da FSJ reúne as condições necessárias para o diálogo privado e confidencial com o doente, bem como a prestação de outros serviços farmacêuticos [99]. O gabinete está equipado com uma maca, com ajuste lombar para administração de injetáveis e vacinas não incluídas no Plano Nacional de Vacinação (PNV) e ainda para a consulta de Pé-diabético, serviço de enfermagem, e aconselhamento dermocosmético. Neste gabinete existe ainda uma mesa e cadeiras para realização das determinações dos parâmetros bioquímicos e da pressão arterial, com auxílio de equipamentos devidamente calibrados.

3.3.4. Piso inferior da FSJ

O piso inferior da FSJ dispõe de escritório, armazém secundário, laboratório e uma zona de copa, tal como referido anteriormente. No escritório são arquivados todos os documentos referentes à faturação, consentimentos informados, contabilidade e administração da farmácia. O armazém secundário permite o armazenamento de todos os produtos que não tenham espaço na área de armazenamento primário ou nos lineares, devido às quantidades existentes ou dimensões das embalagens.

A FSJ dispõe de um laboratório equipado de acordo com as exigências legais, apesar de não se preparem medicamentos manipulados na farmácia. Todos os manipulados pedidos na FSJ são preparados na Farmácia Diamantino, no Fundão e devidamente encaminhados para a FSJ quando prontos. No laboratório existe uma pequena biblioteca, constituída por Farmacopeia Portuguesa, Formulário Galénico Português, Manual do Direito Farmacêutico e Prontuário Terapêutico, sendo este último de carácter obrigatório [99], [100].

Por último, a zona da copa é constituída por forno microondas, frigorífico, forno, chaleira, máquina de café, mesa e cadeira.

3.3.5. Equipamentos

Segundo o Manual de Boas práticas em Farmácia Comunitária, o Diretor Técnico (DT) deve garantir que o equipamento necessário à atividade da farmácia se encontra disponível e em funcionamento, cumprindo com o desempenho requerido e tem aprovado um plano de manutenção quando necessário, de calibração e de controlo entre calibrações para demonstrar o seu funcionamento adequado.

Na FSJ a Doutora Dina Esteves, Diretora Técnica, está responsável por estas funções e garante que todo o equipamento é adaptado e adequado aos produtos dispensados na farmácia e é alvo de manutenção e validação periódica, dos quais fazem parte a balança, o tensiómetro, o equipamento para a realização dos testes bioquímicos, termohigrómetros e o frigorífico.

3.4. Recursos Humanos

A FSJ tem uma equipa constituída por dois farmacêuticos, dos quais, uma diretora técnica, e uma técnica de farmácia, cumprindo com disposto nos artigos 23º e 24º do Decreto-Lei nº307/2007 de 31 de Agosto, alterado pelo Decreto-Lei nº 171/2012, de 1 de Agosto [100], [101]. Os recursos humanos da FSJ são constituídos pela Dr^a. Dina Esteves, Diretora Técnica (DT), pelo Dr. Alexandre Espírito Santo, Farmacêutico, e pela Dr^a. Cátia Pereira, Técnica de Farmácia. Para além disso, a farmácia conta ainda com uma auxiliar de limpeza, Sr^a Natália e um distribuidor para auxiliar nas entregas ao domicílio, Sr. Fábio.

De acordo com o Decreto-Lei 307/2007 de 31 de Agosto, alterado pelo Decreto-Lei nº 171/2021, de 1 de Agosto, ao Diretor Técnico compete, para além das obrigações do ato farmacêutico, assumir a responsabilidade pelos atos farmacêuticos praticados na farmácia, garantir que a farmácia possui condições de higiene e segurança adequadas e verificar o cumprimento das regras deontológicas da atividade farmacêutica.

Na **Tabela 1** são apresentadas as funções extra ao atendimento e ato farmacêutico de cada elemento da equipa.

Tabela 5. Recursos Humanos da Farmácia São João com respetivas funções desempenhadas.

Dr ^a . Dina Esteves	Dr. Alexandre Espírito Santo	Dr ^a . Cátia Pereira
Receituário	Logística e Portfólio	Logística e Portfólio
Qualidade	Intervenção Farmacêutica	Atendimento Holon
Marketing e Comunicação	Projetos e Serviços	
Intervenção Farmacêutica	Atendimento Holon	
Atendimento Holon		

3.5. Sistemas informáticos

O *Sifarma2000*, patentado pela Glintt, é o software utilizado na FSJ para efetuar atendimentos, gerir e rececionar encomendas e ainda, gerir a faturação, utentes e produtos. Durante todo o meu estágio tive a oportunidade de contactar com o *Sifarma2000* e perceber a sua relevância no dia-a-dia da farmácia, uma vez que para além do exposto anteriormente, permite durante o atendimento realizar encomendas instantâneas no caso de o produto não estar disponível na farmácia, pesquisar por substância ativa quando são medicamentos sem grupo homogêneo ou medicamentos prescritos noutros países, consulta científica rápida de cada produto, como por exemplo, indicações terapêuticas, contraindicações, advertências, interações medicamentosas, posologia e indicações terapêuticas. Todas estas características do *Sifarma2000* permite um melhor e mais completo atendimento ao utente. Na FSJ existe também um software para o controlo da temperatura e humidade, com recurso a um termohigrómetro, e ainda um sistema de videovigilância.

4. Informação e Documentação Científica

O farmacêutico é por excelência o profissional de saúde que reúne as condições necessários no aconselhamento e seguimento contínuo ao utente e por isso deve manter o seu conhecimento atualizado e validade em fontes de informação científica. Por isso, no processo da cedência de medicamentos ou outros produtos farmacêuticos, o farmacêutico deve obrigatoriamente de dispor de acesso a fontes de informação sobre indicações, contraindicações, interações, posologia e precauções com o uso do medicamento. São consideradas fontes de acesso obrigatório no momento da cedência do medicamento, o Prontuário Terapêutico (PT) e Farmacopeia Portuguesa (FP) [100], [102].

A FSJ tem à disposição na sua biblioteca Farmacopeia Portuguesa (FP), Formulário Galénico Português (FGP), Manual do Direito Farmacêutico e Prontuário Terapêutico (PT), possui ainda protocolos de Atendimento Holon e mapas de apoio ao fornecimento de medicamentos. Efetivamente, durante o atendimento o próprio *Sifarma2000* fornece informação sobre composição qualitativa, posologia, indicações terapêuticas, interações, contraindicações e reações adversas, facilitando assim o atendimento e aconselhamento. Para além disso, uma vez que todos os computadores na FSJ têm acesso à internet, é possível aceder à base de dados nacional de medicamentos de uso humano do INFARMED I.P., a Infomed, onde é possível pesquisar os diversos RCM de forma rápida para esclarecimentos adicionais.

Por último, também é possível consultar as circulares informativas da Associação Nacional das Farmácias (ANF) e do INFARMED I.P., bem como materiais cedidos pelos delegados de informação médica.

5. Medicamentos e outros produtos de saúde

Os medicamentos carecem de um regime jurídico próprio, com a premissa de proteger a saúde pública e assegurar a disponibilidade de medicamentos de qualidade, seguros e eficazes. Segundo o estatuto do medicamento, medicamento “é toda a substância ou associação de substâncias apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em seres humanos ou dos seus sintomas ou que possa ser utilizada ou administrada no ser humano com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou, exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas”. Partindo desta definição, numa farmácia comunitária são dispensados outros produtos de saúde que não medicamentos, como produtos cosméticos e dermofarmacêuticos, dietéticos e nutracêuticos, fitoterapêuticos, homeopáticos, produtos de higiene e ainda dispositivos médicos, e produtos de uso veterinário.

No que diz respeito à dispensa ao público, os medicamentos podem ser divididos em dois grandes grupos, Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM) e Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) [103]. Na **Tabela 2** abaixo estão indicadas as particularidades e subdivisões destas duas grandes classes.

Tabela 6. Medicamentos classificados quanto à dispensa ao público.

MSRM	MNSRM
Medicamentos de receita médica renovável - destinam-se a doenças específicas ou tratamentos prolongados e permitem adquirir os medicamentos mais de uma vez sem ser necessária a renovação da prescrição.	MNSRM – Não preenchem nenhum dos requisitos dos MSRM. Não são comparticipados, salvo exceções previstas na legislação que define o regime de comparticipação do estado no preço dos medicamentos.
Medicamentos de receita médica restrita – medicamentos cuja utilização está reservada a certos meios	Medicamentos não sujeitos a receita médica com dispensa exclusiva em farmácia (MNSRM-EF) – O INFARMED

<p>especializados por preencherem uma das condições:</p> <p>Uso exclusivo hospitalar</p> <p>Patologias cujo diagnóstico seja efetuado apenas em meio hospitalar ou estabelecimentos diferenciados com meios de diagnóstico específicos e adequados.</p> <p>Pacientes em tratamento ambulatorio</p>	<p>pode reclassificar os MSRM em MNSRM dependentes de dispensa exclusiva em farmácia. Esta dispensa deve atender ao perfil de segurança destes medicamentos ou às suas indicações terapêuticas, tendo por base os protocolos de dispensa disponibilizados.</p>
<p>Medicamentos de receita médica especial – medicamentos estupefacientes ou psicotrópicos; medicamentos cuja utilização anormal possam dar origem a riscos importantes de abuso medicamentoso, toxicodependência ou uso para fins ilegais; medicamentos com uma substância, que devido às suas propriedades ou novidade, se considere incluída no referido anteriormente.</p>	

Da mesma forma que existe uma grande variedade de medicamentos, também existem diferentes sistemas de classificação, que agrupam os medicamentos consoantes características. Na **Tabela 3** estão apresentados alguns dos sistemas de classificação mais utilizados.

Tabela 7. Sistemas de Classificação.

<p>Classificação ATC (Anatomical Therapeutic Chemical)</p>	<p>Recomendada pela OM.</p> <p>Agrupar os medicamentos de acordo com as suas características terapêuticas e químicas e/ou com o sistema ou órgãos onde vai atuar.</p>
<p>Classificação Farmacoterapêutica</p>	<p>Agrupar os medicamentos de acordo com as suas finalidades terapêuticas.</p> <p>Consta do Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos e do Prontuário Terapêutico.</p>

Classificação por forma farmacêutica	Agrupa os medicamentos quanto à forma farmacêutica em que se encontram disponíveis no mercado.
---	--

Na farmácia para além dos medicamentos existem ainda dispositivos médicos, produtos farmacêuticos homeopáticos e produtos cosméticos, também eles regulamentados pelo INFARMED I.P.

Dos produtos de saúde mencionados, apenas os dispositivos médicos e os produtos cosméticos possuem legislação independente do Estatuto do medicamento (Decreto-Lei nº176/2006, de 30 de agosto). Os dispositivos médicos englobam um vasto conjunto de produtos ao abrigo de várias diretivas da Comunidade Europeia (CE), e são destinados a serem utilizados como meios de prevenção, diagnóstico ou tratamento, contudo atingem estes fins por mecanismos que não se traduzem numa ação farmacológica, metabólica ou imunológica, diferindo assim dos medicamentos [104]. O Decreto-lei nº 145/2009, de 17 de junho regula toda a atividade subjacente aos dispositivos médicos e respetivos acessórios e transpõe para a ordem jurídica interna a Diretiva nº2007/47/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 5 de Setembro.

De acordo com a definição legal, produto cosmético é qualquer substância ou mistura que entra em contacto com as partes externas do corpo ou com os dentes e mucosas bucais, e cuja função pode ser limpar, perfumar, modificar o aspeto, proteger, manter em bom estado ou corrigir odores corporais. Assim, os produtos cosméticos abrangem um amplo espectro de produtos e são regulamentados pelo Regulamento (CE) nº 1223/2009.

6. Aprovisionamento e Armazenamento

Os stocks traduzem-se em bens disponíveis na farmácia para serem dispensados ao utente e dependem da procura, oferta, do meio em que a farmácia se insere, espaço de armazenamento, disponibilidade, entre outros fatores que influenciam no método de gestão dos stocks. O correto aprovisionamento e armazenamento em períodos de tempo curtos na farmácia comunitária permite uma gestão de stocks eficaz e eficiente, de forma a suprir as necessidades dos doentes [105].

O aprovisionamento é a primeira etapa do circuito do medicamento, no que respeita à farmácia comunitária, e prende-se resumidamente com a aquisição e receção dos medicamentos e produtos de saúde para que estejam disponíveis ao utente. Após o aprovisionamento, os medicamentos e outros produtos de saúde são armazenados nos sítios destinados com condições adequadas à sua conservação [99].

6.1. Fornecedores e encomendas

A escolha dos fornecedores prende-se muitas vezes com a qualidade do serviço, quanto ao número de entregas diárias e cumprimento dos prazos de entrega, bem como, fatores financeiros, nomeadamente, tabela de preços praticados, descontos promocionais e planos de bonificação dos produtos.

Os principais distribuidores grossistas que fornecem a FSJ são a OCP Portugal – Produtos Farmacêuticos, S.A., e a Empifarma – Produtos Farmacêuticos, S.A. A OCP Portugal entrega duas encomendas diárias à FSJ e a Empifarma entrega apenas uma encomenda, exceto aos sábados, domingos e alguns feriados. As encomendas aos distribuidores anteriormente mencionados é realizada duas vezes por dia, no caso da OCP e uma vez por dia, no caso da Empifarma.

Diariamente, o *Sifarma2000* gera propostas de encomendas para ambos os fornecedores, tendo em conta o stock mínimo e máximo definido previamente. O stock máximo define-se pela quantidade máxima de determinado produto na farmácia e o stock mínimo define quando deve ser efetuada nova encomenda do produto. Os números que constam dos stocks máximo e mínimo são definidos tendo em conta as necessidades, sazonalidade, campanhas promocionais e histórico de vendas da farmácia. Tendo em conta tudo isto, a encomenda é validada pelo farmacêutico ou técnico de farmácia antes de enviado o pedido ao fornecedor.

Para além disso, durante o atendimento se forem necessários produtos que não têm stock imediato na FSJ, no *Sifarma2000* pode ser verificado o stock remoto das restantes farmácias do grupo e confirmado via telefónica. No caso de outra farmácia do grupo na Covilhã possuir o produto pretendido, o utente pode ser encaminhado à mesma ou pode ser solicitada a permuta dos produtos e envio para a FSJ. Quando nenhuma farmácia possui o produto pretendido é efetuada uma encomenda instantânea ao fornecedor durante o ato do atendimento, através do *Sifarma2000*. Assim, é efetuada a encomenda e respetiva reserva do produto associada à ficha do utente, que pode ser paga no ato da encomenda ou no ato da entrega. O utente fica com o comprovativo da reserva, onde consta o número da reserva, nome do utente, produtos encomendados e respetivo CNP (Código Nacional do Produto), bem como o estado do pagamento, além disso, é sempre fornecida ao utente a informação de previsão de entrega do produto. Quando se trata de produtos rateados ou dispositivos médicos personalizados as encomendas podem ser feitas pelo telefone diretamente ao fornecedor e é realizada uma encomenda manual no *Sifarma2000*.

Pontualmente podem ser realizadas encomendas diretamente aos laboratórios, quando se trata de produtos a adquirir em grandes quantidades e torna-se mais vantajoso economicamente para a farmácia. Estas encomendas periódicas podem ser em Equipamentos de Proteção individual (máscaras cirúrgicas e FFP2, luvas, desinfetantes) no âmbito do atual contexto da Pandemia Covid-19, bem como produtos de nutrição (Nestlé®) e dermocosmética.

Assim, na **Tabela 4** encontramos os principais tipos de encomendas possíveis de efetuar.

Tabela 8. Tipos de encomendas

Instantâneas	Efetuadas durante o atendimento, através do <i>Sifarma2000</i> ou através do telefone.
Diárias	Efetuadas com base no stock mínimo de cada produto, duas vezes por dia. O <i>Sifarma2000</i> com base no stock mínimo faz uma proposta de encomenda, a qual é confirmada e acertada manualmente antes de ser aprovada e enviada ao fornecedor.

Diretas	Efetuada diretamente ao laboratório ou fabricante, sem passar pelo armazenista, por representar maior benefício económico.
Via Verde	Efetuada quando se trata de medicamentos de disponibilidade reduzida. Os produtos encomendados por via verde têm prioridade em relação às restantes encomendas.
Manuais	Efetuada nos casos em que os motivos não se enquadrem nos apresentados anteriormente.

6.2. Receção e verificação de encomendas

A FSJ recebe duas encomendas de manhã, uma de cada fornecedor e uma encomenda à tarde da OCP Portugal. As encomendas chegam em contentores de plástico ou contentores herméticos, quando se trata de produtos termolábeis, ou, menos comumente, podem chegar em caixas de cartão, mas todos são identificados com o nome da Farmácia. Todas as encomendas devem vir acompanhadas da respetiva fatura ou guia de remessa, onde se verifica sempre se a encomenda se destina à farmácia. Nas faturas consta o número da fatura, data, identificação da farmácia e fornecedor, produtos encomendados e respetiva quantidade enviada, IVA (imposto de valor acrescentado), PVF (preço de venda à farmácia) e PVP (preço de venda ao público), este último apenas consta nos MSRM e dispositivos médicos com participação pelo SNS.

De seguida, abrem-se os contentores e verifica-se o estado de conservação das embalagens. Os produtos termolábeis, são retirados dos contentores e guardados no frio, até que seja dada a sua entrada no sistema informático. No *Sifarma2000*, no menu “Receção de encomendas”, seleciona-se a encomenda a rececionar e é introduzido número da fatura, valor total, número de embalagens da encomenda e nos casos aplicáveis, o valor da *fee* (apenas para encomendas da Empifarma). São depois registados os produtos, pelo código de barras, QR code ou CNP, ao mesmo tempo devem ser verificadas as validades das caixas que acabaram de chegar com a validade que se encontra no sistema. No caso de a validade do produto rececionado ser menor que a validade do produto na farmácia, a validade deve ser alterada no sistema para a menor validade disponível. Depois de introduzidos todos os produtos, deve verificar-se se o número de embalagens rececionadas corresponde ao número de embalagens inseridas inicialmente e todos os PVF e PVP dos produtos inseridos.

Na eventualidade do PVF ter alterado, deve ser atualizado o PVP, apenas para os produtos com PVF diferente, não interferindo com o preço anterior no caso de existir stock do produto na farmácia.

Quando são conferidos todos os parâmetros anteriores a receção da encomenda termina. No caso de existirem medicamentos estupefacientes e psicotrópicos (MEP) o *Sifarma2000* pede o registo da fatura correspondente. Depois, a fatura é assinada e datada pelo elemento da equipa que deu entrada da encomenda, e no final são conferidas todas as reservas que constam da encomenda e os produtos separados por número de reserva e estado de pagamento, no móvel destinado às reservas.

Por fim, se no ato da receção for detetado um produto danificado, no final é feita uma devolução do mesmo ao fornecedor. Posteriormente, a fatura é arquivada e os restantes produtos arrumados nos locais predefinidos.

6.3. Devoluções

A devolução de produtos pode ter vários motivos, sendo eles não conformidade do produto, produto danificado, produto não encomendado, produto encomendado por engano, PVF superior ao esperado, quantidade superior à encomendada, prazo de validade a terminar ou produto retirado do mercado ou com ordem de recolha pelo INFARMED I.P.

Efetivamente, para proceder à devolução é criada uma nota de devolução no menu “Gestão de Devoluções” do *Sifarma2000*, onde se seleciona o fornecedor ao qual se pretende a devolução, os produtos a serem devolvidos, o número da fatura original, o preço faturado, bem como o motivo para a devolução. Assim, a nota de devolução é emitida e impressa em triplicado que é carimbada, assinada e datada por quem efetuou a devolução. Os produtos são colocados nos contentores acompanhados da nota de devolução original e respetivo duplicado. Na farmácia fica arquivado o documento triplicado que é assinado e datado pelo distribuidor quando recolhe os produtos. A devolução é comunicada à AT (Autoridade Tributária) e na nota de devolução vem mencionado o número da AT, no caso de haver fiscalização é este número que permite verificar se está tudo conforme.

Quando o fornecedor aceita a devolução, pode realizar a regularização da devolução com reembolso por meio de nota e crédito ou substituir os produtos. Quando o fornecedor não aceita as devoluções, os produtos são reenviados para a farmácia e posteriormente é feita quebra destes produtos, havendo a possibilidade de gestão da devolução com o laboratório correspondente.

Para além disso, no caso de ser uma devolução de produtos ou lote por ordem do INFARMED, são localizados todos os produtos existentes na farmácia e os laboratórios ou distribuidores fazem a recolha dos mesmos.

6.4. Marcação de preços e margens legais de comercialização

O Decreto-Lei nº176/2006, de 30 de agosto alterado pelo Decreto-Lei nº 20/2013, de 14 de fevereiro valida a responsabilidade do INFARMED, I.P quanto à regulamentação e autorização dos preços dos medicamentos participados pelo SNS. Em Portugal, existem regimes diferentes para a definição dos preços dos medicamentos. Os MSRM são sujeitos a um regime de preço máximo ou a um regime de preços notificado, enquanto que os MNSRM têm um regime de preço livre.

“O PVP dos medicamentos a introduzir pela primeira vez em Portugal, assenta na comparação com os preços nos estádios de produção e importação (PVA) praticados nos países de referência para o mesmo medicamento, ou, caso este não exista, para as especialidades farmacêuticas idênticas ou essencialmente similares nos países de referência (Espanha, França, Itália e Eslovénia), ao qual acrescem as margens máximas de comercialização (armazenista e farmácia), a taxa de comercialização e o IVA.” – INFARMED, I.P.

A Portaria nº290-A/2016, de 15 de novembro altera a Portaria nº195-C/2015 que estabelece as regras para a formação, alteração e revisão de preços dos MSRM e MNSRM participados, bem como as suas margens de comercialização, é alterada também a Portaria nº154/2016, de 27 de maio, que regula o regime de preços notificados dos MSRM não participados ou não participáveis.

Segundo o que consta da Portaria nº290-A/2016, de 15 de novembro, no caso dos medicamentos não genéricos, o preço não pode exceder o PVA mais baixo em vigor nos países de referência, para qualquer das especialidades farmacêuticas existentes em cada um desses países. Quando se trata de medicamentos genéricos, o preço deve ser no mínimo 30% inferior ao preço máximo do medicamento de referência com igual dosagem e forma farmacêutica.

Para além disso, os preços dos produtos de venda livre são atribuídos pela farmácia consoante a margem de lucro expectável, concorrência e IVA.

6.5. Gestão de prazos de validade

A verificação do prazo de validade dos produtos na FSJ efetua-se em 3 momentos distintos, durante a receção da encomenda, aquando da introdução dos produtos no *Sifarma2000*, no momento da dispensa para garantir que todos os produtos dispensados têm validade abrangente, e ainda, mensalmente.

Efetivamente, mensalmente é emitida uma listagem de produtos a terminar a validade nos próximos 3 meses, e é a partir desta listagem que se procede à verificação física de todos os produtos listados, verificando-se a validade e número de embalagens. Os produtos que se verificarem com validade a terminar são separados num armário destinado a estes produtos, para que estes tenham prioridade na dispensa.

Quando existem produtos listados que não correspondem à validade descrita, procede-se ao acerto das quantidades e validade no *Sifarma2000*.

6.6. Controlo de temperatura e humidade

As zonas de armazenamento da farmácia devem respeitar as condições de iluminação, temperatura e humidade específicas para medicamentos e outros produtos farmacêuticos, segundo o que consta das Boas Práticas Farmacêuticas (BPF) para a farmácia comunitária.

Efetivamente, para garantir o cumprimento de todas as condições a FSJ dispõe de termohigrómetros, localizados no frigorífico, armazém, zona de armazenamento primário e na zona de atendimento ao público. Todas as zonas da farmácia, com a exceção do frigorífico, devem apresentar uma temperatura entre os 15 e 25°C, e o valor de humidade deve ser inferior a 60%. O frigorífico deve apresentar uma temperatura compreendida entre 2 e 8°C, considerando as devidas oscilações aquando da abertura do mesmo, e a humidade deve estar compreendida entre 80 e 100%.

Por fim, as medições de cada aparelho devem ser descarregadas e registadas no computador e os respetivos gráficos devem ser analisados.

6.7. Armazenamento

O armazenamento de medicamentos obriga a cuidados especiais, tal como referido anteriormente é necessário garantir condições de temperatura, humidade e luminosidade

controlados, de forma a respeitar as condições para os diversos produtos. Para além disso, o armazenamento de todos os produtos obedece à regra FEFO (*First Expire – First Out*) permitindo que os produtos com prazo de validade menor sejam dispensados em primeiro lugar. Quando existem produtos sem prazo de validade, como é o caso de produtos ortopédicos, ou produtos com a mesma validade são arrumados segundo a regra FIFO (*First In- First Out*). Os produtos termolábeis são armazenados no frigorífico por ordem alfabética e aplicam-se as regras FEFO e FIFO com os mesmos critérios.

7. Interação farmacêutico-utente- medicamento

O farmacêutico é o especialista do medicamento e o agente de saúde pública que mais proximidade tem com a população. Muitas vezes é ao farmacêutico que o utente recorre mesmo antes de se dirigir ao médico, sendo este ato mais acentuado pela Pandemia Covid-19. A proximidade com o utente não se traduz apenas pela proximidade física, mas vai muito além disso e assenta na confiança que o utente deposita no farmacêutico, porque este se mostra sempre disponível a ajudar e a contribuir para a melhoria da sua saúde. Durante o meu estágio, tive a oportunidade de assistir a diversas situações em que o utente se dirigia à farmácia só para ter a opinião de um dos elementos da equipa, porque é na farmácia que deposita a sua confiança.

Segundo o artigo 10º do Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos “*A principal responsabilidade do farmacêutico é para com a saúde e bem-estar do doente e do cidadão em geral, devendo pôr o bem dos indivíduos à frente dos seus interesses pessoais ou comerciais e promover o direito a um tratamento com qualidade, eficácia e segurança.*” Para além disso, no âmbito dos cuidados farmacêuticos o farmacêutico tem a responsabilidade de promover o uso racional dos medicamentos e de monitorização dos doentes, enquanto profissionais que integram o sistema de saúde [99].

Efetivamente, para um farmacêutico comunitário a comunicação em saúde com os utentes é um ponto fulcral, onde se preconiza influenciar as decisões dos utentes no sentido de promover a saúde. Esta comunicação deve ter por objetivos promoção e educação em saúde, prevenção de riscos e doenças, sugestão de mudanças comportamentais, informação sobre doenças e sobre a saúde. Resumidamente, toda a comunicação é expressa em dois níveis, verbal e não-verbal, sendo que a comunicação verbal exterioriza o ser social e é expressa pela linguagem falada ou escrita, e a comunicação não-verbal exterioriza o psicológico e assenta na demonstração de sentimentos. O conhecimento científico do farmacêutico é importante, mas pouca relevância tem se o profissional não apresentar um bom

relacionamento interpessoal, empatia e assertividade, por isso é importante adaptar sempre a postura e linguagem ao nível sociocultural do utente [106].

O atendimento Holon é padronizado nas farmácias do grupo, mas permite a personalização, tendo em conta cada utente. A comunicação com o utente não deve ser unidirecional, por isso a aproximação ao utente deve ser feita por meio de perguntas abertas, que permitam obter a informação necessária sobre o motivo de deslocamento à farmácia e a partir daí iniciar o aconselhamento farmacêutico. A primeira fase do atendimento permite conhecer as dúvidas do utente, possíveis erros, efeitos secundários e assim estabelecer uma relação de confiança com o utente.

O ato de receber o utente deve fomentar a sua empatia para facilitar a comunicação com o mesmo. A maioria dos utentes que frequentam a FSJ são idosos polimedicados com patologias crónicas, e muitas vezes esta população carece de muita atenção, porque as posologias não vêm descritas nas recitas ou quando há alteração de medicamentos, e é dever do farmacêutico informar o doente, assegurando sempre se este entende para que efeito é a medicação e a forma de tomar (como, quantas vezes e quando). Os efeitos secundários devem ser referidos com cautela para não instituir medo no utente e este evite tomar a medicação, os benefícios devem ser maximizados em relação aos riscos.

Durante o estágio, presenciei e vivenciei várias situações de erros de toma da medicação, não apenas em idosos, mas também em população mais jovem, por falta de informação do uso correto do medicamento. Uma situação bastante comum é os utentes tomarem bilastina de forma incorreta, os casos que tive a oportunidade de aconselhar faziam a bilastina às refeições, quando esta deve ser tomada 1h antes de comer ou 2h depois, devido à interferência dos alimentos no mecanismo de ação do fármaco. Este pequeno gesto tem um grande impacto para o utente e permite reduzir a toma diária de bilastina de vários comprimidos, para apenas um.

A dispensa de medicamentos ocorre sempre após a validação pelo farmacêutico da medicação prescrita, para despistar possíveis erros de duplicação ou erro na prescrição, bem como no aconselhamento de medicamentos em regime de automedicação, quando o utente procura em primeiro lugar a ajuda do farmacêutico, aqui é essencial ter em conta toda a informação do utente e adequar os medicamentos em cada caso.

7.1. Farmacovigilância

A Farmacovigilância é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a “ciência e as atividades que se relacionam com a deteção, a avaliação, a compreensão e a prevenção de reações adversas ou de qualquer problema que se relacione com fármacos”.

Em Portugal, o Sistema de Farmacovigilância está organizado em 3 patamares, sendo eles a Unidade Regional de Farmacovigilância (URF), o Sistema Nacional de Farmacovigilância (SNF), que é coordenado pelo INFARMED I.P., e a Agência Europeia do Medicamento (EMA). Caso sejam detetadas reações adversas aos medicamentos (RAM) na FSJ, estas são notificadas e posteriormente analisadas pela Unidade de Farmacovigilância da Beira Interior, que é responsável pelas notificações da região de Viseu, Guarda e Castelo Branco.

Atualmente, todas as RAM podem ser submetidas online no Portal RAM por profissionais de saúde ou utentes e, idealmente, a submissão deverá ser feita até dez dias após a ocorrência. Deve ser relatado tudo para que a avaliação sobre a situação seja a mais completa possível.

Durante o estágio não identifiquei qualquer RAM nos utentes da FSJ, contudo aprendi que é importante estabelecer uma relação de confiança com o utente, para que ele sinta à vontade connosco quando algo corre menos bem e assim possa transmitir toda a informação, por mais pequena que seja.

7.2. Medicamentos fora de uso - VALORMED

A reciclagem é cada vez mais importante não apenas no lixo comum, mas também nos medicamentos e respetivas embalagens, folhetos, blisters, frascos e bisnagas. A VALORMED é uma sociedade sem fins lucrativos, e surge com a premissa de responder ao desafio de implementar um sistema para a recolha e tratamento dos resíduos de medicamentos, respondendo com um processo de recolha e tratamento seguros, evitando que estes resíduos sejam acessíveis como outros resíduos urbanos, contribuindo para a preservação ambiental e protegendo a saúde pública.

Na FSJ, incentivamos os utentes a trazer os seus medicamentos fora de uso e a depositá-los no contentor, disponibilizado pela VALORMED para este efeito. Quando este contentor atinge a capacidade máxima é selado e pedida a sua recolha pela OCP através do *Sifarma2000*, inserindo o lote e número de série do contentor em questão. Após este

processo é impresso um talão onde consta a informação da farmácia, número de série do contentor, um campo para a assinatura do Farmacêutico e outro para a assinatura do armazenista.

8. Dispensa de medicamentos

A dispensa de medicamentos é a atividade mais significativa realizada em farmácia comunitária e de grande responsabilidade para o farmacêutico. Segundo as Boas Práticas Farmacêuticas para a Farmácia Comunitária, “a cedência de medicamentos é o ato profissional em que o farmacêutico, após avaliação da medicação, cede medicamentos ou substâncias medicamentosas aos doentes mediante prescrição médica ou em regime de automedicação ou indicação farmacêutica, acompanhada de toda a informação indispensável para o correto uso dos medicamentos. Na cedência de medicamentos o farmacêutico avalia a medicação dispensada, com o objetivo de identificar e resolver problemas relacionados com os medicamentos (PRM), protegendo o doente de possíveis resultados negativos associados à medicação”.

Efetivamente, é extremamente importante existirem procedimentos para a receção da prescrição e respetiva confirmação, no caso dos MSRM, e ainda para a indicação farmacêutica, no caso de MNSRM ou MNSRM-EF, os quais serão abordadas nos capítulos seguintes.

Assim, tendo em conta o tipo de dispensa efetuada, os medicamentos classificam-se em MSRM e MNSRM. Entre os MSRM podem ainda ser classificados como genéricos ou de referência, sendo os medicamentos de referência os que recebem autorização de introdução no mercado (AIM) com base em documentação completa, medicante apresentação de ensaios farmacêuticos, pré-clínicos e clínicos. Por outro lado, os medicamentos genéricos possuem a mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias ativas, mesma forma farmacêutica e a mesma bioequivalência com o medicamento de referência, demonstrada por estudos de bioequivalência [103]. Mediante o previsto na legislação, as farmácias devem ter sempre um stock mínimo de três dos cinco medicamentos genéricos mais baratos de cada grupo homogêneo, para que o utente seja livre de exercer o seu direito de opção.

8.1. Dispensa de Medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM)

A dispensa de MSRM prende-se com a existência de uma prescrição médica, que pode ser eletrónica ou manual. Existem atualmente três tipos de receitas possíveis, sendo elas receitas manuais, receitas eletrónicas materializadas ou eletrónicas desmaterializadas/receitas sem papel (RSP).

De acordo com a Portaria nº224/2015, de 27 de julho, quando não há possibilidade por parte do prescriptor para realizar a prescrição eletrónica, este deverá apresentar uma das seguintes justificações: falência informática; inadaptação do prescriptor; prescrição no domicílio ou limite de prescrição até 40 receitas por mês [107]. Uma das quatro opções descritas anteriormente, deve estar assinalada, o não preenchimento da mesma pode implicar a inviabilidade da receita, devendo o farmacêutico confirmar sempre o seu preenchimento. A receita manual possui uma validade de 30 dias seguidos, contando da prescrição, e nela apenas podem ser prescritos 4 medicamentos, 1 caixa de cada um, ou 2 caixas por medicamento, nunca excedendo as 4 caixas por receita. No entanto, existe a exceção da prescrição de medicamentos com apresentação em forma unitária, sendo permitido prescrever quatro caixas numa só receita. Para além disso, a receita não é renovável o que implica que seja toda dispensada num único momento e posteriormente arquivada na farmácia para posterior comparticipação. No caso de o médico prescriptor não indicar o tamanho da embalagem, é cedida a embalagem com o menor número de unidades.

Conforme o Artigo 12º da Portaria nº224/2015, de 27 de julho, a receita manual só é válida se incluir os seguintes elementos:

- vinheta identificativa do local da prescrição, identificação da especialidade e contacto do prescriptor, referência a regime especial de comparticipação de medicamentos, denominação comercial do medicamento, código nacional de prescrição eletrónica do medicamento (CNPEM) ou outro código oficial identificador do produto, apenas quando aplicáveis;
- vinheta identificativa do médico prescriptor;
- nome e número de utente;
- assinatura do médico prescriptor;
- dosagem, forma farmacêutica, dimensão da embalagem, número de embalagens;
- data da prescrição.

As receitas eletrônicas materializadas têm características comuns com as receitas manuais, sendo que podem ser prescritos 4 medicamentos distintos, num total de 4 embalagens por receita, e no máximo podem ser prescritas 2 embalagens por medicamento. Quando existem medicamentos em forma unitária podem ser prescritas até 4 embalagens do mesmo medicamento ou 12 embalagens quando são tratamentos de longa duração. Estras prescrições geralmente têm uma validade de 30 dias a contar da data de emissão, podendo ir até aos 6 meses de validade quando são prescritas como receita eletrônica renovável com 3 vias. Cada via possui inscrita a menção da via respetiva e um número de receita único. A dispensa por cada via é única, ou seja, após dispensar uma via essa mesma não pode ser dispensada mesmo que o utente não levante todas as unidades disponíveis na mesma.

As receitas eletrônicas desmaterializadas ou receitas sem papel (RSP) são enviadas via SMS ao utente e podem ser acedidas na aplicação MySNS Carteira ou no portal SNS, para além disso podem ser impressas as guias de tratamento das mesmas, onde constam os códigos para aceder à receita através do *Sifarma2000*. Atualmente, as RSP representam o maior volume de receitas dispensadas, possuindo a vantagem de o utente adquirir a quantidade que pretende de cada linha da prescrição desde que a mesma esteja dentro da validade. Cada linha de prescrição de uma RSP pode conter 2 embalagens, quando se trata de tratamentos de curta duração, com validade de 30 ou 60 dias, ou 6 embalagens quando se trata de tratamentos de longa duração, sendo que nestes casos a validade é de 6 meses, a partir da data de emissão. No caso de embalagens unitárias podem ser prescritas 4 embalagens do mesmo medicamento ou 12 embalagens, nos casos de tratamento de longa duração. Para além disso, mediante justificação médica é possível prescrever um número de embalagens superior, ao anteriormente mencionado, e com validade superior a 12 meses.

Efetivamente, em qualquer tipo de receita a prescrição deverá ser feita por DCI (Denominação Comum Internacional) e incluir a dosagem, forma farmacêutica, quantidade e posologia. A prescrição poderá ser por nome comercial nos seguintes casos previstos: medicamento de margem ou índice terapêutico estreito; uma reação adversa previamente reportada a outros medicamentos com a mesma substância; ou prescrição para continuidade de um tratamento com duração superior a 28 dias [107].

Assim, durante o meu estágio pude contactar com os três tipos de receitas e proceder às respetivas dispensas. Para além disso, ainda efetuei dispensa de receitas ao abrigo de planos de complementaridade ou participação especial, os quais serão abordados no capítulo seguinte.

8.2. Regimes de comparticipação

A legislação prevê atualmente a possibilidade de comparticipação dos medicamentos através de um regime geral e de um regime especial, onde o regime especial apenas se aplica a situações específicas como determinadas patologias ou grupos de doentes. Então, os MSRM podem ser sujeitos a comparticipação do estado português mediante prescrição aos beneficiários do SNS ou de outros subsistemas públicos de saúde. A Portaria nº 195-D/2015, de 30 de junho, estabelece os grupos e subgrupos farmacoterapêuticos de medicamentos que podem ser objeto de comparticipação e os escalões respetivos. Existem 4 escalões A, B, C ou D e são comparticipados em 90%, 69%, 37% e 15 %, respetivamente, sendo a comparticipação. A comparticipação assume uma percentagem do PVP do medicamento e varia consoante o regime de comparticipação [108].

Na FSJ as comparticipações que ocorrem com maior frequência são feitas através do regime geral, pelo SNS, ou através de regime especial, pelo organismo SNS-Pensionistas. Para além disso, na Covilhã são muito frequentes receitas com regime de comparticipação de medicamentos aos pensionistas, que até 1984 descontaram para o Fundo Especial de Segurança Social do Pessoal da Indústria de Lanifícios. De acordo com a Portaria nº 287/2016, de 10 de novembro, alterada pela Portaria nº 154/2018, de 28 de maio, os Trabalhadores da Indústria dos Lanifícios têm comparticipação de 100% do PVP do medicamento. Dentro do regime de comparticipação especial, na FSJ temos também utentes com comparticipação de produtos destinados ao autocontrolo da diabetes mellitus (DM) e uma utente comparticipação de produtos dietéticos com carácter terapêutico.

Durante o estágio pode também contactar com casos de complementaridade da comparticipação, sendo eles diplomas legais e subsistemas de comparticipação, como os CTT, Serviço de Assistência Social (SAMS) do Sindicato dos Bancários, Multicare. Nestes casos o utente abrangido deverá apresentar um cartão de beneficiário válido, para que se registre no *Sifarma2000* o número do cartão.

8.3. Medicamentos estupefacientes e psicotrópicos

Os Medicamentos Estupefacientes e Psicotrópicos (MEP) atuam diretamente no sistema nervoso central e podem atuar como estimulantes ou depressores, com repercussões em todo o organismo. Devido às suas propriedades e por serem também associados a atividade ilícita são sujeitos a legislação especial, e a sua dispensa difere dos restantes medicamentos. As substâncias que são classificadas como estupefacientes ou psicotrópicos estão

discriminadas nas tabelas I e II do Decreto-Lei nº15/93, de 22 de janeiro, e no nº1 do artigo 86.º do Decreto-Regulamentar nº61/94, de 12 de outubro. No caso de estes medicamentos serem prescritos numa receita manual, têm de ser prescritos isoladamente, nas RSP não existe esta obrigação.

Importa referir ainda que durante o ato da dispensa o adquirente deve apresentar sempre um documento de identificação que deve ser verificado e os dados são de preenchimento obrigatório no *Sifarma2000*. Deve ser registado o nome do utente, data de nascimento, número e validade do documento de identificação apresentado, e estes mesmos dados devem ser preenchidos para o adquirente, que pode ser o mesmo que o utente ou não.

8.4. Dispensa de proximidade de medicamentos hospitalares

A dispensa de medicamentos hospitalares nas Farmácias Comunitárias permite ao utente a acessibilidade ao medicamento de forma mais cómoda e uma maior adesão à terapêutica. Existem atualmente vários programas nos hospitais com este serviço disponível, sendo possível ao utente escolher a farmácia da sua preferência para efetuar o levantamento da medicação. A pandemia Covid-19, por meio da Operação Luz Verde, permitiu que se comesçassem a efetuar mais dispensas de medicamentos hospitalares em tempo mais curto para garantir o acesso ao medicamento.

Na FSJ, temos vários programas, sendo o mais significativo o PEMProxi (Programa de entrega de medicamentos de proximidade) do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra (CHUC) que permite que o medicamento chegue à farmácia através da Empifarma, assegurando-se sempre as devidas condições de armazenamento de segurança. Quando os medicamentos dão entrada na farmácia, o utente é avisado que a medicação já se encontra disponível para levantamento. Os medicamentos veem acompanhados de 2 folhas com a informação do utente e informação farmacoterapêutica, que deverão ser assinadas e datadas pelo utente ou responsável pelo seu levantamento. Aquando da dispensa é preenchida, por um farmacêutico, toda a informação relativa à dispensa no *Sifarma Clínico*.

9. Automedicação

A automedicação consiste no estabelecimento de um tratamento farmacológico com MNSRM por iniciativa do doente. O doente dirige-se à farmácia para pedir o medicamento e o farmacêutico deve sempre orientar para a utilização ou não dos medicamentos solicitados para automedicação, fomentando o uso racional do medicamento [99]. Aquando

da automedicação poderá ocorrer cedência de medicamentos por indicação farmacêutica, onde o farmacêutico poderá sugerir, se necessário, um produto mais indicado para a condição do utente. Durante o meu estágio existiram algumas situações semelhantes, uma delas foi o aconselhamento e cedência do Atyflor em detrimento do UL-250 para tratar a diarreia, uma vez que o Atyflor é um simbiótico que permite apenas uma toma por dia e possuiu 7 estirpes de probióticos e fructooligossacarídeos, sendo mais completo e cómodo para o utente.

Efetivamente, quando o utente se dirige à farmácia a solicitar um MNSRM é de extrema importância recolher o máximo de informação sobre o estado do utente para compreender se a opção terapêutica se adequa, se é necessária, se interage com outros medicamentos que o utente possa estar a tomar ou se são necessários cuidados médicos. É importante que a prática da automedicação não se banalize e que seja sempre acompanhada por aconselhamento farmacêutico, uma vez que o mau uso da mesma poderá mascarar sintomas ou até causar interações medicamentosas. A legislação prevê no anexo do Despacho nº17690/2007, de 23 de julho as situações passíveis de automedicação, consideradas um transtorno menor ou sintoma menor, entendido como um problema de carácter não grave, não autolimitante e de curta duração, que não esteja relacionado com manifestações de outros problemas de saúde do doente.

Os MNSRM distinguem-se ainda dos MNSRM-EF, uma vez que estes últimos só podem ser cedidos numa Farmácia Comunitária, sob a intervenção farmacêutica e se constarem do Anexo I do Regulamento dos medicamentos não sujeitos a receita médica de dispensa exclusiva em farmácia. Durante o meu estágio tive a oportunidade de dispensar MNSRM e MNSRM-EF, sendo a maioria das situações referentes a distúrbios gastrointestinais, hemorroidas, dores de garganta, congestão nasal, alergia, gripes e constipações, insónias, contraceção hormonal de emergência, dermatite de contacto, fungos e dores musculoesqueléticas.

10. Aconselhamento e dispensa de outros produtos de saúde

10.1. Produtos de dermofarmácia, cosmética e higiene

Como referido anteriormente, um produto cosmético é qualquer substância ou mistura que entra em contacto com as partes externas do corpo ou com os dentes e mucosas bucais, e cuja função pode ser limpar, perfumar, modificar o aspeto, proteger, manter em bom estado

ou corrigir odores corporais. Assim sendo, na FSJ temos uma vasta gama de produtos cosméticos que se pressupõem às funções mencionadas.

Efetivamente, todos estes produtos são de venda livre, contudo o aconselhamento farmacêutico pode ser valioso e decisivo na aquisição do produto mais adaptado às necessidades do utente. O farmacêutico deve identificar a necessidade do utente e avaliar se existe a necessidade de consulta médica ou se poderá indicar uma solução. Na FSJ, temos várias gamas direcionadas para a limpeza dos dentes e mucosas, higiene corporal, pele atópica, hidratação da pele, proteção solar, limpeza do rosto e tratamento capilar. Entre as gamas de hidratação temos produtos anti-envelhecimento, para peles oleosas ou acneicas e peles sensíveis com vermelhidão. Nas gamas de tratamento capilar temos produtos anti-queda, fortificantes, para couro cabeludo sensível, entre outros.

Durante o meu estágio tive a oportunidade de aconselhar alguns destes produtos, sendo que num dos atendimentos a utente tinha aplicado produtos para pele oleosa e feito exfoliação diária da pele que resultou na pele da mesma irritada em descamação, perante isto aconselhei a aplicação de um creme apaziguante da Avène, evitar as esfoliações diárias, lavagem com um gel mais hidratante e se caso não existissem melhorias para regressar à farmácia. A utente regressou à farmácia por outros motivos e a situação da irritação e descamação estava resolvida. Outra situação decorrida durante do estágio, foi uma utente que me pediu um corticóide tópico e após questionar o porquê a mesma explicou que seria para aplicar num eczema no contorno do olho. Expliquei que naquela zona a última opção seria o corticóide e que deveríamos começar por um creme para eczema das pálpebras da Ducray, e efetuei a dispensa do mesmo.

10.2. Produtos dietéticos para alimentação especial

Existem na farmácia vários produtos dietéticos para alimentação especial que dão resposta a diferentes problemas e populações. Estes produtos são muito procurados para a população geriátrica, doentes com disfagia, diabéticos, doentes em risco de nutrição, doentes oncológicos, entre outros. Na FSJ existem vários produtos para alimentação entérica como espessantes, papas multivitamínicas, preparações multivitamínicas líquidas hiperproteicas e hipercalóricas, produtos específicos para as dificuldades de mastigação e/ou deglutição.

Relativamente às participações nestes produtos, pode estar associado um Programa de Apoio Especial (PAE) que os participa em complementaridade ou não com o SNS. Os

produtos que beneficiam de comparticipação constam da lista disponível no site da Direção Geral de Saúde (DGS), e seguem as mesmas regras dos medicamentos no que respeita o número de embalagens e validade de prescrição.

Durante o meu estágio na FSJ tive contacto com o produto Glycosade que é um amido de milho com alto teor de amilopectina, adaptado para as necessidades de utentes com doenças de armazenamento de glicogénio (DSG). Este produto tem comparticipação do estado em 100% do seu PVP.

10.3. Produtos dietéticos infantis

A ESPGHAN (Sociedade Europeia de Gastroenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição), a Comissão de Nutrição da Sociedade Portuguesa de Pediatria e a OMS concordam que o lactente pode ser exclusivamente amamentado durante os primeiros 6 meses de idade, e a amamentação deve ser mantida a par da introdução da dieta familiar, até aos 12/24 meses. Caso o aleitamento materno seja insuficiente ou não seja possível, deve utilizar-se em complementaridade ou em alternativa fórmulas infantis, cuja composição é adaptada às necessidades do lactente.

Atualmente, existe uma grande variedade de fórmulas para lactentes e leites de transição, e ainda leites sem lactose, hipoalergénicos, anti-regurgitação, anti-obstipantes e para bebés prematuros. Existe ainda uma gama variada de papas pré-preparadas ou em pó. Assim, consoante a necessidade é possível escolher o leite mais indicado e ainda adaptar o leite durante o crescimento da criança, por exemplo o teor proteico do leite é um dos parâmetros que acompanha o crescimento.

Por último, importa referir que o aleitamento materno mesmo que intercalado com a fórmula infantil traz sempre vantagens comparativamente com a alimentação exclusiva com fórmula infantil, uma vez que se adapta mediante as necessidades imediatas do lactente [109], [110].

10.4. Fitoterapia e suplementos nutricionais

Um medicamento à base de plantas é definido como qualquer medicamento que contenha exclusivamente substâncias ativas derivadas de plantas ou preparações à base de plantas, de acordo com o Decreto-Lei nº176/2006, de 30 de agosto. Durante o meu estágio os pedidos mais frequentes de fitofármacos foram de produtos para a obstipação (Agiolax),

produtos com ação sedativa (Valdispert), produtos para infecções urinárias recorrentes (arando vermelho), produtos para a redução do colesterol (levedura de arroz vermelho) e produtos para a redução do apetite (Konjac).

O suplementos alimentares são géneros alimentícios, regidos pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), e são constituídos por fontes concentradas de nutrientes, ou outras substâncias com efeito nutricional ou fisiológico que se destinam a complementar e/ou suplementar o regime alimentar normal, não devendo ser utilizados como substitutos de uma dieta variada, segunda consta do Decreto-Lei nº 136/2003, de 28 de junho. Durante o estágio depois de perceber qual a medicação habitual do utente, outros suplementos consumidos, produtos à base de plantas, produtos homeopáticos, patologias crónicas e necessidades do utente, aconselhei e dispensei alguns suplementos com diversas finalidades, com vitaminas e minerais diversos.

10.5. Medicamentos de uso veterinário

Um medicamento de uso veterinário (MUV) é uma substância ou associação de substâncias com propriedades curativas, preventivas, ou de diagnóstico, utilizada num animal, exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica e que restaure, corrija ou modifique as funções fisiológicas de um animal, de acordo com o estipulado pelo Decreto-Lei nº148/2008, de 29 de julho.

Durante o meu estágio tive a oportunidade de aconselhar e dispensar alguns MUV, nomeadamente para animais de companhia. Aquando do aconselhamento é importante saber sempre qual é o animal, a sua idade e peso, para a indicação dos produtos ser a mais correta. Os produtos mais dispensados foram os desparasitantes internos e externos, no caso dos internos é sempre importante aconselhar um desparasitante em profilaxia, para os respetivos donos. Para além disso, pude ainda ver algumas prescrições de médicos veterinários em que faziam o ajuste de dose dos medicamentos de uso humano à dose para o animal em questão.

10.6. Dispositivos médicos

Os dispositivos médicos são usados diariamente por profissionais de saúde e público em geral, sendo importantes instrumentos de saúde, uma vez que o seu impacto na saúde e nas despesas com os cuidados de saúde são significativos. Os dispositivos médicos são destinados a fins comuns aos dos medicamentos, como prevenir, diagnosticar ou tratar uma

doença, contudo os seus mecanismos não incluem ações farmacológicas, metabólicas ou imunológicas.

Existem 4 classificações para os dispositivos médicos consoante os potenciais riscos, características ou funcionamento do dispositivo:

- Classe I – baixo risco
- Classe IIa – baixo médico risco
- Classe IIb – alto médico risco
- Classe III – alto risco

Para as classes anteriormente mencionadas também é tida em conta a invasibilidade do dispositivo, duração do contacto, zona anatómica e vulnerabilidade da mesma.

Durante o meu estágio pude aconselhar e dispensar diferentes dispositivos médicos, nomeadamente, termómetros, tensiómetros, seringas, compressas, luvas, preservativos e máscaras cirúrgicas/FFP2. Existem ainda dispositivos médicos em forma de xarope (Grintuss®) e grânulos anti-diarreicos (SmectaGo®), entre outros.

Por último, importa referir que a partir do dia 26 de maio de 2021 se aplica o Regulamento de Dispositivos Médicos (RDM) com a revogação da legislação nacional, no que é abrangido pelo RDM (Decreto-Lei nº145/2009 e Lei nº21/2014).

11. Outros cuidados de saúde prestados

Enquanto Farmácia do Grupo Holon, a FSJ disponibiliza uma variedade de serviços farmacêuticos para promoção de saúde e bem-estar, previstos na legislação. Assim, a FSJ disponibiliza:

- Serviço Check Saúde;
- Administração de Vacinas e Injetáveis;
- Serviço de Consulta Farmacêutica;
- Serviço de Cessaçã Tabágica;
- Serviço de Pé-Diabético;
- Serviço de Podologia;
- Serviço de Nutrição;
- Serviço de Dermofarmácia;
- Preparação Individualizada de Medicação (PIM).

Durante o meu estágio tive contacto com o serviço de check saúde, administração de vacinas e injetáveis e pé-diabético, os quais serão abordados nas secções seguintes.

11.1. Serviço de Check Saúde

O Serviço Check Saúde consiste na medição dos parâmetros bioquímicos (glicémia capilar, colesterol, triglicéridos; ácido úrico) e dos parâmetros fisiológicos (pressão arterial). Este serviço é prestado no gabinete de atendimento individualizado para maior privacidade do utente e um aconselhamento que permita instruir o utente sobre medidas não farmacológicas complementares à terapêutica e que contribuam para um estado de mais saúde.

Durante o meu estágio pude efetuar todos os tipos de medições mencionadas, maioritariamente a utentes idosos. Este serviço mostra ser de extrema importância para a saúde dos utentes, uma vez que permite detetar situações ainda não diagnosticadas e encaminhar para a consulta médica, bem como monitorizar a efetividade de terapêuticas novas.

11.2. Serviço de administração de vacinas e injetáveis

A administração de vacinas e injetáveis não incluídos no PNV deve ser realizada por farmacêuticos com formação reconhecida pela Ordem dos Farmacêuticos, sendo que na FSJ a administração é realizada pela Dr.^a Dina Esteves.

Efetivamente, sempre que é administrado um injetável na FSJ é registado o nome do utente, data de nascimento, medicamentos ou outras vacinas administradas, lote e validade do injetável, via de administração e identificação do farmacêutico que efetua a administração. Depois do preenchimento dos dados é efetivada a administração no gabinete de atendimento individualizado, que se encontra equipado no caso de reação anafilática.

11.3. Serviço de pé diabético

O serviço de pé diabético é prestado mensalmente por um enfermeiro e permite a avaliação da função arterial na pessoa com diabetes, sendo determinante para a prevenção diagnóstico e tratamento de complicações.

O pé diabético é uma das principais complicações mais graves da diabetes, podendo resultar em amputações parciais ou totais, por isso este serviço é imprescindível aos doentes com

diabetes, permitindo também instruir o utente de medidas preventivas necessárias na sua condição.

11.4. Projetos na comunidade

As Farmácias do grupo Holon são farmácias dinâmicas e em estreito contacto com a população, desenvolvendo vários projetos e atividades na comunidade. Durante o meu estágio tive a oportunidade de participar num rastreio de dois dias, que decorreu na empresa J3LP, no parque industrial do Fundão. A atividade consistiu na medição da glicémia capilar, medição da pressão arterial, determinação de parâmetros antropométricos (peso, altura, IMC) e sensibilizar para risco de desenvolver diabetes mediante preenchimento de um questionário.

12. Preparação de medicamentos

12.1. Medicamentos Manipulados

A industrialização no setor farmacêutico levou à diminuição do volume de medicamentos manipulados preparados nas farmácias comunitárias. Há atualmente situações que ainda justificam a preparação de medicamentos manipulados, sendo elas preparações de aplicação tópica, preparações para uso pediátrico com ajuste de dosagem e preparações para doentes com farmacocinética ou condições de administração alteradas que justifiquem alterar a forma farmacêutica.

Efetivamente, a FSJ não prepara medicamentos manipulados, contudo tive a oportunidade de presenciar a preparação dos mesmos na Farmácia Diamantino (FD), no Fundão, e ainda aprender sobre toda a dinâmica de um laboratório de uma Farmácia Comunitária. Durante a experiência na FD, colaborei na preparação de uma Solução oral de Nitrofurantoína a 0,5% e uma Solução oral de cloridrato de propranolol a 10 mg/ml, sendo que ambas as preparações se destinavam a uso pediátrico.

Um medicamento manipulado é qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico [111]. Quando dá entrada na FSJ uma prescrição em que conste “manipulado” ou “FSA” (faça segundo a arte), é feito um pedido de orçamento à FD e o mesmo é dado ao utente, podendo este escolher se adquire ou não o manipulado. Em caso de a resposta ser afirmativa a FD prepara o

manipulado e posteriormente envia o mesmo para a FSJ, respeitando todas as condições de conservação aquando do transporte.

O farmacêutico deve sempre verificar a prescrição e certificar de que as matérias-primas não implicam contraindicações, que não há interação com outros medicamentos que o utente toma e de que não há interações entre os componentes do manipulado prescritos. Quando a prescrição se encontra correta é elaborado um procedimento e são realizados todos os cálculos necessários à preparação do manipulado, para que tudo aconteça com o maior rigor possível e que possa ser repetido o método de preparação do manipulado. Após a preparação, são realizados os ensaios de qualidade e registados os resultados dos mesmos.

Os laboratórios das farmácias são extensamente regulamentados e possuem uma lista de material obrigatório, bem como normas relativas à prescrição, ao fabrico, à preparação, às substâncias permitidas e/ou proibidas, ao regime de preços e participações de manipulados, que permite conferir e garantir a credibilidade, segurança, e manutenção do reconhecimento terapêutico enquanto especialidade farmacêutica [111].

Para além disso, as matérias primas devem ser sempre acompanhadas do seu boletim de análise e da ficha do produto que garante a conformidade do produto com as exigências das monografias das farmacopeias. Na FD, as fichas das matérias primas e boletins de análise ficam guardadas em suporte digital e em papel, bem como as fichas de preparação e prescrições de manipulados.

A rotulagem dos medicamentos manipulados deve fornecer toda a informação necessária ao utente e é da responsabilidade do farmacêutico, para além disso, deve conter sempre identificação da farmácia, identificação do farmacêutico diretor técnico, nome do utente, fórmula do medicamento, número de lote atribuído, prazo de validade, condições específicas de conservação, instruções especiais, via de administração e posologia.

Por último, o preço do medicamento manipulado é calculando partindo do custo das matérias primas, honorários de manipulação, custo do material de embalagem e respetivos fatores multiplicativos definidos na Portaria nº769/2004, de 1 de julho, para além disso, acresce ainda o valor do IVA a 6%. Alguns manipulados não possuem qualquer tipo de participação, contudo o Despacho nº18694/2010, de 18 de novembro, aprova uma lista de manipulados com 30% de participação. Para aceder à participação o médico prescriptor deve indicar na receita substância ou substâncias ativas, respetiva concentração, excipiente, ou excipientes aprovados e forma farmacêutica.

12.2. Preparações extemporâneas

As preparações extemporâneas são definidas como pós ou grânulos que podem ser solúveis e originar soluções, ou insolúveis e originar suspensões. A maioria das preparações extemporâneas no mercado são antibióticos, comercializados em forma de pó para posterior preparação da suspensão oral. A apresentação em pó permite garantir uma maior estabilidade e prolongar o prazo de validade destes produtos.

Os medicamentos em preparações extemporâneas são preparados mediante a adição da quantidade de água purificada indicada pelo fabricante, durante o ato da dispensa. Devem ser dadas indicações ao utente de como conservar o medicamento e dos cuidados a ter antes de cada toma. Na FSJ são preparados alguns antibióticos desta forma, tendo tido a oportunidade de preparar o Zoref, granulado para suspensão oral (cefuroxima axetil), no caso deste antibiótico é importante instruir o utente para o guardar no frio não mais de 10 dias, deve agitar sempre antes de usar e deve ser tomado após as refeições para melhor absorção do fármaco.

13. Receituário e faturação

Os utentes pagam parte do valor dos medicamentos, tal como referido anteriormente, contudo a maior parte do valor das receitas é recebido pela farmácia em comparticipações, por isso para a farmácia receber o reembolso de todas as comparticipações é necessário conferir as receitas aviadas na farmácia durante cada mês. No final de cada mês é realizada a verificação do receituário manual e eletrónico materializado, confirmando-se a dispensa correta dos medicamentos. Em caso de haver algum erro o utente deve ser contactado para o caso ser resolvido e a farmácia reembolsada.

Nas receitas é verificado o número, o lote, a série da receita, o organismo de comparticipação, medicação dispensada, dosagens, formas farmacêuticas, dimensões de embalagem, PVP e encargos ao utente. As receitas sujeitas a esta verificação são datadas, assinadas e carimbadas por quem efetua a dispensa e assinadas pelo utente no ato da dispensa.

A conferência das receitas manuais e eletrónicas materializadas ocorre ao longo de todo o mês, para corrigir possíveis incongruências antes do final do mês, e ir organizando as mesmas por organismos e lotes. O número do lote é atribuído pelo Sifarma2000, que agrupa as receitas em lotes de 30. No final do mês, quando se fecham os lotes são impressos os

verbetes respetivos, onde consta o número de receitas, número de embalagens comparticipadas, bem como PVP total, preço a pagar pelo utente e valor da comparticipação. Posteriormente, as receitas que dizem respeito ao SNS e seus subsistemas são anexadas aos respetivos verbetes e enviadas para o Centro de Conferência de Faturas (CCF), até à data estipulada por este organismo. Após este procedimento, o estado paga as comparticipações dos medicamentos dispensados às farmácias. No entanto, os verbetes dos lotes de receitas correspondentes a outras entidades são enviados para a Associação Nacional de Farmácias (ANF). Para as receitas eletrónicas desmaterializadas existe um único lote eletrónico, e o *Sifarma2000* fecha automaticamente os lotes à meia noite do último dia do mês, iniciando posteriormente uma nova sequência de lote.

Para além disso, para o CCF deve ser ainda enviada a relações resumos de lotes; guia de proveitos; fatura eletrónica mensal; notas de débito ou crédito caso existam.

14. Considerações finais

O meu estágio permitiu-me entender que na farmácia comunitária não nos podemos limitar a dispensar e aconselhar medicamentos, o utente deve sempre ser o centro da nossa atenção e a componente humana não pode ser deixada de lado na nossa prática diária. O conhecimento científico isolado não nos permite ser bons profissionais, mas a sua associação com outras valências pode realmente ajudar-nos a comunicar e a chegar até ao utente fazendo a diferença.

O estágio deve ser um momento de aprendizagem e de consolidação e acredito que o meu me permitiu abrir horizontes e a ter uma visão mais holísticas das pessoas atrás dos utentes. Todas as orientações que recebi durante o estágio permitiram-me não só aprender, mas entender o impacto que a farmácia comunitária pode ter na vida das pessoas.

Comecei este segundo capítulo por referir o símbolo da farmácia e falando da cobra e da taça, na FSJ aprendi que os farmacêuticos e técnicos de farmácia são como as cobras, que mudam de pele e se adaptam independentemente da situação pela saúde do utente. Agradeço à equipa da FSJ e espero um dia ser como eles.

Referências bibliográficas

- [1] J. R. Pita and V. Bell, “A farmácia em Portugal nos últimos 30 anos. Algumas reflexões sobre a farmácia de oficina ou comunitária,” *Debater a Eur.*, no. 15, pp. 197–215, 2016, doi: 10.14195/1647-6336_15_11.
- [2] A. Sousa, Micaela; Pita, João; Pereira, “Farmácia E Medicamentos Em Portugal Em Meados Do a Século XX: O Papel Da Comissão Reguladora Dos Produtos Químicos E Farmacêuticos (1940),” *CEM Cult. Espaço Memória*, vol. 5, pp. 11–26, 2014.
- [3] Ordem dos Farmacêuticos, *Boas Práticas Farmacêuticas para a farmácia comunitária (BPF)*, vol. 3ª Edição. 2009.
- [4] INFARMED I.P., “Decreto-Lei n.º 307/2007, de 31 de Agosto - Regime jurídico das farmácias de oficina,” *Diário da República*, 1.ª série, no. 168, pp. 6083–91, 2007.
- [5] Ministério Da Saúde, “Decreto-Lei n.º 171/2012, de 1 de Agosto,” *Diário da República*, 1.ª série – N.º 148, pp. 4030–4045, 2012.
- [6] INFARMED I.P., “Deliberação n.º414/CD/2007,” *Legislação Farmacêutica Compilada*. 2007.
- [7] INFARMED I.P., “Decreto-Lei n.º176/2006, de 30 de Agosto,” *Diário da República*, pp. 1–250, 2006, [Online]. Available: https://www.infarmed.pt/documents/15786/1068535/035-E_DL_176_2006_12ALT/d2ae048e-547e-4c5c-873e-b41004b9027f.
- [8] INFARMED, “Dispositivos médicos,” 2021. <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/dispositivos-medicos>.
- [9] M. Pedro, “A Importância da Gestão de Stocks na Farmácia Comunitária: Tendências Atuais.” Universidade de Coimbra, p. 30, 2015.
- [10] J. A. C. Teixeira, “Comunicação em saúde: Relação Técnicos de Saúde - Utentes ,” *Análise Psicológica* , vol. 22. scielopt , pp. 615–620, 2004.
- [11] INFARMED I.P., “Normas relativas à dispensa de medicamentos e produtos de saúde,” *Ministério da Saúde*, vol. 3, pp. 1–23, 2014.
- [12] INFARMED I.P., “Margens de Comercialização em Portugal,” pp. 1–5, 2015.
- [13] T. Carvalho, *Alimentação nos primeiros 1000 dias: Um presente para o futuro*. Associação Portuguesa de Nutrição.
- [14] C. Rêgo et al., *Alimentação saudável dos 0 aos 6 anos - Linhas De Orientação Para Profissionais e Educadores*, no. 1. 2019.
- [15] Infarmed I.P., “Medicamentos Manipulados,” *Infarmed*, p. 72, 2005.