



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Adriana Ramalho Alves

Relatórios de estágio e Monografia intitulada “Nanopartículas Lipídicas como Sistemas de Entrega de Macromoléculas” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação do Dr. Sérgio Rodrigues, da Dra. Sandra Palma e do Professor Doutor João Nuno Sereno de Almeida Moreira, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Adriana Ramalho Alves

Relatórios de estágio e Monografia intitulada “Nanopartículas Lipídicas como Sistemas de Entrega de Macromoléculas” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação do Dr. Sérgio Rodrigues, da Dra. Sandra Palma e do Professor Doutor João Nuno Sereno de Almeida Moreira, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro 2021

Eu, Adriana Ramalho Alves, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2016233731, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Nanopartículas Lipídicas como Sistemas de Entrega de Macromoléculas” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 27 de outubro de 2021.

Adriana Ramalho Alves

(Adriana Ramalho Alves)

AGRADECIMENTOS

Como não sei a quem agradecer primeiro fica como início um OBRIGADA a todas as pessoas que de alguma forma permitiram que eu aqui estivesse hoje: pais, avós, tia, primas e amigos. Este grupo ajudou a proporcionar-me um belo conjunto de 5 anos e merecem o meu agradecimento aqui imortalizado.

Dou uma palavra de apreço também à equipa da Farmácia Roldão, como já vos disse: “Quando for grande quero ser como vocês!”.

Também à equipa dos Laboratórios Expanscience, um agradecimento pelas experiências que tive a oportunidade de vivenciar.

Ao Professor Doutor João Nuno, obrigada pelas palavras de ânimo e por não ter desistido de mim. Demorei mas foi! Grata por tudo.

Ao Dr. Sérgio, obrigada pela sua disponibilidade e simpatia. O que aprendi consigo é inapagável.

À Dra. Sandra Palma, agradeço os momentos de descontração e toda a partilha de conhecimentos. Gostei muito da dupla que formámos.

Maracujás, que são como irmãos, que me irritam tanto quanto me orgulham, que partilham todas as vitórias e dissabores comigo, estamos Mestre ó quê?!

Às minhas Doras (mais os devidos anexos) que são o que me sempre unirá a Coimbra. Grata por esta ligação tão bonita.

Aos meus colegas de casa do Palacete: a minha segunda família, a minha segunda casa. Obrigada por isso.

Por fim, só tenho um obrigada (maior do que alguma vez caberia neste documento) a Coimbra. Aqui vivi dias (e noites) inesquecíveis, que só esta cidade sabe como.

ÍNDICE

PARTE I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

ABREVIATURAS	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. FARMÁCIA ROLDÃO	9
3. ANÁLISE SWOT	10
3.1. Pontos Fortes	10
3.1.1. Independência na elaboração de tarefas.....	10
3.1.2. Rotatividade de colaboradores.....	12
3.1.3. Estagiária única	12
3.1.4. Entregada entre colaboradores e equipa empenhada	13
3.1.5. Cedência de medicamentos hospitalares em ambulatório	13
3.2. Pontos Fracos	13
3.2.1. Ausência de procedimentos operacionalizados	13
3.2.2. SIFARMA 2000®	14
3.2.3. Medicamentos manipulados.....	14
3.3. Oportunidades	14
3.3.1. Novo módulo de atendimento SIFARMA	14
3.3.2. Pandemia COVID-19	15
3.4. Ameaças	15
3.4.1. Número de organismos/seguradoras ou diferentes procedimentos para diferentes organismos	15
3.4.2. Pandemia COVID-19	16
4. CASOS PRÁTICOS	17
5. CONCLUSÃO	19

PARTE II – Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

REFERÊNCIAS	20
ABREVIATURAS	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. LABORATÓRIOS EXPANSCIENCE	24
3. ANÁLISE SWOT	25
3.1. Pontos Fortes	25
3.1.1. Contacto com diferentes estatutos de produtos.....	25
3.1.2. Acompanhamento de várias áreas de trabalho	26
3.1.3. Colaboradores.....	28
3.1.4. Competências	28
3.2. Pontos Fracos	29
3.2.1. Não comercialização de medicamentos	29
3.2.2. Coincidência de tempo de estágio com férias da equipa dos LE	29
3.3. Oportunidades	30
3.3.1. Desenvolvimento de portal e aplicação. Sales Force.....	30
3.3.2. Aula na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto	30

3.4. Ameaças	31
3.4.1. Situação Pandémica	31
4. CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	33
PARTE III – Monografia “Nanopartículas Lipídicas como Sistemas de Entrega de Macromoléculas”	
RESUMO.....	36
ABSTRACT	37
ABREVIATURAS.....	38
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS.....	41
3. NPL COMO SISTEMA DE ENTREGA DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	43
3.1. Ácidos Nucleicos	43
3.2. Composição das NPL.....	45
3.2.1. Lípidos permanentemente catiónicos e lípidos <i>helper</i>	46
3.2.2. Lípidos catiónicos ionizáveis.....	48
3.2.3. Lípidos PEGuilados	49
3.2.4. Lípidos biodegradáveis.....	49
3.3. Formulação das NPL.....	50
3.4. Exemplos clínicos de NPL e ácidos nucleicos.....	50
3.4.1. Onpattro®	51
3.4.2. Vacinas contra o SARS-CoV-2.....	52
3.5. NPL e entrega extrahepática.....	54
4. NPL COMO SISTEMA DE ENTREGA DE CRISPR/CAS9.....	55
4.1. Terapia génica	55
4.2. Enzimas de edição de genes.....	56
4.3. CRISPR-Cas9	56
4.3.1. Métodos de entrega do sistema CRISPR/Cas9-NPL.....	58
4.3.2. Exemplos de ensaios clínicos de CRISPR/Cas9 e NPL.....	58
5. CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	61

PARTE I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Roldão

Sob orientação do Dr. Sérgio Rodrigues

ABREVIATURAS

COVID-19: Doença Infeciosa de Coronavírus

EC: Estágio Curricular

EPI: Equipamento de Proteção Individual

FR: Farmácia Roldão

MICF: Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM: Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

MSRM: Medicamento Sujeito a Receita Médica

PIC: Preço Impresso na Cartonagem

PVP: Preço de Venda ao Público

SWOT: *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

I. INTRODUÇÃO

No âmbito do estágio curricular (EC) decorrido em Farmácia Comunitária, parte integrante do plano de estudos do Mestrado Integrado de Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, apresento o relatório de estágio que descreve essa mesma jornada.

No decorrer de um segundo confinamento devido à pandemia de Doença Infecciosa do Coronavírus (COVID-19), iniciei o estágio na Farmácia Roldão (FR) a 11 de janeiro e terminei a 30 de abril com uma soma de 673 horas realizadas, sob a orientação do Diretor Técnico da farmácia, Dr. Sérgio Rodrigues e a restante equipa. Durante esse período tive a oportunidade de aplicar conhecimentos adquiridos nalgumas Unidades Curriculares do plano de estudos do MICF e pude testemunhar em primeira mão profissionais de saúde em ação com a sua devoção dirigida para o bem-estar da população no geral e no utente em individual.

Senti, desde o primeiro dia, a importância do farmacêutico numa determinada comunidade, onde os utentes da farmácia depositam total confiança na pessoa do outro lado do balcão. O que significa que o farmacêutico, por sua vez, tem de apresentar um leque de competências não só técnico-científicas mas também de inteligência emocional para poder exercer a sua profissão com a responsabilidade e ética que lhe é requerida.¹

Ao longo deste relatório apresentarei mais aprofundadamente a minha experiência como estagiária em Farmácia Comunitária nesta Farmácia marinhense. Esse percurso é descrito sob a estrutura de análise SWOT (acrónimo que significa *Strengths*, *Weaknesses*, *Opportunities* e *Threats*, que pode ser traduzido em português para Pontos Fortes, Pontos Fracos, Oportunidades e Ameaças respetivamente) e a apresentação de três Caso-Estudo.

2. FARMÁCIA ROLDÃO

A FR localiza-se na Marinha Grande, de onde sou natural, num local privilegiado: numa avenida de passagem obrigatória para a saída ou entrada na cidade, tendo também bons acessos e estacionamento adequado ao fluxo de utentes da farmácia. Por outras palavras, é considerada uma das maiores e melhores farmácias do concelho.

A direção técnica e propriedade da farmácia está ao encargo do Dr. Sérgio Rodrigues e a equipa é composta, de momento, por 4 farmacêuticos, 2 técnicos de farmácia, 1 responsável pelo *backoffice* e 1 auxiliar de limpeza.

A sala de atendimento ao público é ampla, com um trajeto marcado no chão até aos balcões por forma a manter os 2 metros de distância mínima entre utentes, como indica o Plano de Contingência COVID-19, e é composto por 6 balcões, podendo então estar 6 utentes a serem atendidos concomitantemente na farmácia. Para além do espaço de atendimento, a farmácia conta também com um gabinete de atendimento personalizado ao público, onde se pode ter um atendimento mais reservado, ou onde podem ocorrer determinações de parâmetros decorrentes da prestação de serviços farmacêuticos (determinação de glicémia, colesterol total, triglicéridos e pressão arterial). Outros espaços integrantes da farmácia são o laboratório, zona de recolhimento, instalações sanitárias, armazém e gabinete da direção técnica. Não sendo todos os locais obrigatórios, eu considero-os imprescindíveis para o bom funcionamento da farmácia.²

Do que percecionei, os utentes da FR são na sua maioria idosos, o que justifica que a venda de Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM) seja a maior fonte de receita da farmácia. Mas não desfazendo das outras fontes, a FR tem uma boa oferta de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) tal como outros produtos de dermocosmética, puericultura, veterinária, suplementação, higiene oral e outros.

3. ANÁLISE SWOT

Tabela I: Análise SWOT

Internamente		Externamente	
Pontos Fortes	Pontos Fracos	Oportunidades	Ameaças
Independência na elaboração de tarefas	Ausência de atribuição de tarefas fixas aos colaboradores	Novo módulo de atendimento SIFARMA	Pandemia COVID-19
Rotatividade de colaboradores	SIFARMA 2000®	Pandemia COVID-19	Número de organismos/seguradoras ou diferentes procedimentos para diferentes organismos
Estagiária única	Medicamentos manipulados		Comparticipação de medicamentos apenas em caso de especialista
Entreajuda nos colaboradores e equipa empenhada			
Cedência de medicamentos hospitalares em ambulatório			

3.1. Pontos Fortes

3.1.1. Independência na elaboração de tarefas

Iniciei o estágio a realizar tarefas de *backoffice*. Apesar de ser algo mecanizado, é importante para a gestão de *stocks* e para o bom funcionamento da farmácia. Como eu já tinha realizado um estágio de Verão numa farmácia comunitária, já tinha alguma segurança na realização de tarefas necessárias para a receção de encomendas e armazenamento dos produtos.

O *software* de receção era o SIFARMA 2000® e era processado tendo em conta a priorização de produtos termolábeis (os primeiros a dar entrada no sistema e a ser armazenados nas câmaras frigoríficas), os prazos de validade, as reservas, a quantidade encomendada, a quantidade recebida, o estado físico dos produtos, o Preço Impresso na Cartonagem (PIC) e em caso de este não existir, a determinação da margem e Preço de Venda ao Público (PVP). No entanto, é necessário resolver os casos da encomenda quando esta não está conforme, isto é, a encomenda pode ter um produto não encomendado, pode ter

produtos danificados ou pode ter produtos em falta. Para os dois primeiros casos, é necessário devolver os produtos ao respetivo armazenista com a sua nota de devolução e no último caso emite-se a nota de crédito respetiva ao produto que devia ter vindo na encomenda. Após a receção dos produtos, inicia-se o armazenamento tendo em conta o local de armazenamento do produto (na sala de atendimento, no armazém ou atrás do balcão de atendimento), se é medicamento e se é de marca ou genérico, se é um medicamento líquido ou pastoso, consoante a ordem alfabética e tendo em conta o prazo de validade. Os produtos de validade mais curta são arrumados de forma a serem os primeiros a serem retirados das prateleiras ou das gavetas, para facilitar o atendimento e diminuir o número de devoluções por prazo de validade. Existe o termo “*first-in first-out*”, a partir do qual desenvolvi a minha estratégia inicialmente, mas rapidamente percebi que por vezes recebíamos produtos de validades menores às que tínhamos em *stock*. Apesar de ser algo que acontecia apenas nos produtos de maior rotatividade e o método de arrumação não ter impacto para a farmácia, eu troquei para a estratégia que descrevi primeiramente.

Estas tarefas rapidamente se tornaram mecanizadas por mim e foi-me dada total autonomia na realização das mesmas, sendo que foi algo que me transmitiu confiança, me obrigou a ser autodidata e ajudou no primeiro contacto com a maioria dos produtos da farmácia. A familiarização com os nomes comerciais começou também nesta primeira etapa.

No final da realização da receção e armazenamento dos produtos das encomendas e antes da realização dessas tarefas no período da tarde, tinha a possibilidade de assistir a vários atendimentos dos colaboradores da farmácia.

Após o domínio das tarefas acima descritas, o meu orientador, Dr. Sérgio, desafiou-me a começar a fazer atendimentos, inicialmente para praticar com o *software* de atendimento (o SIFARMA 2000® e o novo módulo de atendimento) mas foi-me dando espaço para responder a questões no atendimento, passando mais tarde para atendimentos realizados por mim na totalidade, tendo apenas a sua supervisão, da Dra. Sofia ou da Dra. Ana (farmacêuticas na FR). O próximo passo foram atendimentos sem a monitorização, deixando sempre espaço para a retirada de dúvidas e auxílio com qualquer colaborador da farmácia. Para além da autonomia e segurança que fui adquirindo, importante para o restante estágio, senti que estava inserida num ambiente familiar e de confiança, que me oferecia espaço para o erro e para a aprendizagem.

Outra tarefa na qual ganhei autonomia foi na conferência do receituário e faturação. São tarefas simples mas muito importantes para o bom funcionamento da farmácia. A conferência

da medicação prescrita e a dispensada, juntamente com o correto preenchimento dos campos obrigatórios da receita, sem esquecer da atribuição do plano de comparticipação adequado, permitem que se evite prejuízos por parte da farmácia. As receitas materializadas são agrupadas consoante o organismo a que pertencem e no final mês realiza-se a faturação de todas as receitas aviadas até àquele momento (materializadas ou não). Por cada lote (de no máximo 30 receitas) é emitido um verbete no qual se assinala o valor da comparticipação que a farmácia tem a receber. Se um organismo tem mais de 30 receitas, terá mais que um lote e nesse caso também é emitido um resumo de lotes com a mesma informação do verbete. No final da realização desta tarefa para todos os organismos, é emitida por fim as faturas globais. Uma relacionada com a comparticipação do Sistema Nacional de Saúde e outra relativa às seguradoras.³

3.1.2. Rotatividade de colaboradores

A FR é uma farmácia com história na Marinha Grande. Existe há vários anos e muitos dos utentes habituais me falavam das instalações antigas. Duas das colaboradoras da FR já trabalham nesta farmácia há mais de 20 anos e juntamente com a clara experiência que somaram ao longo desses anos, somaram também um grande conjunto de utentes que lhes são fiéis. Através de um atendimento correto e profissional o utente pode querer voltar à farmácia, mas com um atendimento também empático, sincero e personalizado, o utente não só quer voltar como não quer ir a outras farmácias. Com isto quero dizer que, uma das vantagens da FR é que mantém os colaboradores “preciosos” consigo. Pois, muito mais que pela farmácia, os utentes fidelizam-se pelas pessoas e se poderia ser inusitado ouvir “Desculpe menina, mas preferia ser atendida pela Dra. Manuela, se não se importar?”, eu escolhi interpretar este gesto como uma prova da confiança que uma relação farmacêutico-utente pode gerar. A baixa rotatividade de colaboradores ao longo dos anos demonstra a valorização pelos colaboradores profissionais e que fazem a verdadeira diferença na vida dos utentes que atendem e isso contribuiu para que colaboradores mais experientes partilhassem comigo o seu *know-how*.

3.1.3. Estagiária única

Ainda que, no meio do meu estágio a FR tenha contratado um farmacêutico de primeiro emprego, que por vezes necessitava de assistência, o facto de ter sido estagiária única foi extremamente vantajoso. A atenção dos colaboradores da FR estava posta em mim e permitia que todos pudessem manter o seu trabalho e ao mesmo tempo dar-me auxílio sem comprometer os atendimentos ou as tarefas que estavam a realizar. Antes da contratação tive

à minha disposição um balcão de atendimento, que permitiu tanto a otimização do meu tempo como a minha desinibição no atendimento, algo impensável de acontecer se existisse outro estagiário na FR.

3.1.4. Entreajuda entre colaboradores e equipa empenhada

A equipa da FR é bastante competente e instruída. Todas as semanas participavam em formações ou cursos dos mais diferentes temas (diversas doenças, COVID-19, Dermocosmética, Higiene Oral, sistema operativo, entre outros) e o interesse em saber mais pelo melhor aconselhamento possível era contagiante. A vontade de ter o melhor atendimento possível levava a que na farmácia todos os conselhos e pedidos de ajuda ou de segunda opinião fossem bem-vindos. Em caso de incerteza acerca de algum assunto, os colaboradores pediam segundas opiniões aos outros colegas por forma a confirmar o aconselhamento ou a aprimorá-lo. Este espírito de entreajuda é uma mais-valia para qualquer empresa e fazia sentir-me mais proximidade pela equipa por haver reconhecimento da parte deles que “ninguém sabe tudo!”.

3.1.5. Cedência de medicamentos hospitalares em ambulatório

Quando é possível haver continuidade da terapêutica em ambulatório, existe a dispensa de medicamentos hospitalares para a toma em ambulatório. Mas devido à situação pandémica e da distância até à Farmácia Hospitalar que efetuava a cedência da terapêutica, foi permitida a transferência da dispensa de medicamentos hospitalares para locais mais cómodos para o doente (com menor distância geográfica). A cedência destes medicamentos é feita exclusivamente por farmacêuticos através da plataforma Sifarma Clínico®, um *software* partilhado com a Farmácia Hospitalar que estabelece partilha de dados do doente para haver acompanhamento do processo do doente e haver rastreabilidade dos medicamentos cedidos. Na FR havia vários doentes que iam fazer a recolha dos seus medicamentos na farmácia e esta nova responsabilidade do farmacêutico permitia, por um lado trazer a vantagem financeira de poder fidelizar um novo utente na farmácia e por outro foi-me permitido o contacto com novas patologias.

3.2. Pontos Fracos

3.2.1. Ausência de procedimentos operacionalizados

A equipa da FR é uma equipa organizada mas as tarefas realizadas por cada um são tarefas autoimpostas. Não existem procedimentos para a realização correta das tarefas que por vezes eram executadas de modos diferentes. Para além de não haver procedimentos, não havia tarefas destacadas para cada elemento da equipa. Isto dificulta a responsabilização de erros e

identificação de falhas, pois torna-se num obstáculo na determinação do colaborador que cometeu a falha e prejudica na definição de falha por não haver um procedimento que sistematiza os métodos da farmácia.

3.2.2. SIFARMA 2000[®]

Na mudança de *software*, do SIFARMA 2000[®] para o novo módulo de atendimento, não foram ativadas as reservas. O Dr. Sérgio não ativou todas as funcionalidades do novo módulo para resguardar elementos da equipa que estavam com o atendimento otimizado no SIFARMA 2000[®] e que teriam maior dificuldade em se adaptar ao novo módulo, e também salvaguardar a farmácia visto que o novo sistema de atendimento não estava finalizado e ainda apresentava melhorias programadas para o futuro.

No entanto, o facto de não ter as reservas ativadas no novo módulo (só poderiam estar ativados num dos *softwares*) fazia com que os colaboradores que se iam adaptando ao novo sistema, perante uma necessidade de encomendar um produto não existente no *stock* da farmácia, tivessem que a realizar no SIFARMA 2000[®]. Com esta manobra havia uma perda na otimização do tempo de um atendimento.

3.2.3. Medicamentos manipulados

A prescrição de Fórmulas Magistrais ou de Preparados Oficiais permite colmatar a falta de medicamentos para minorias, sendo que, muitas vezes, os manipulados são elaborados para crianças em busca de dosagens menores que as existentes no mercado.⁴

Na FR não existem muitas matérias-primas no laboratório, portanto a maioria dos medicamentos manipulados que eram pedidos, eram reencaminhados para a Farmácia Luciano & Matos em Coimbra que no espaço de 2 dias conseguiam realizar o manipulado e fazer entrega com a colaboração dos armazenistas.

Portanto, só foi possível realizar um manipulado (o único no espaço de 4 meses), o que não foi suficiente para poder relembrar com clareza o conhecimento adquirido nas Unidades Curriculares de Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica.

3.3. **Oportunidades**

3.3.1. Novo módulo de atendimento SIFARMA

Tendo em conta que referi que a mudança de *software* de atendimento foi uma fraqueza do estágio, reconheço também ser uma oportunidade, pois este novo sistema, quando estiver otimizado, com todas as suas valências ativadas e sem tantos erros, irá melhorar bastante o

atendimento das equipas das farmácias e tornar-se-á, para mim, uma mais-valia por já ter tido este primeiro contato. O novo módulo de atendimento é um programa mais intuitivo (não necessita de formação para que rapidamente se domine as suas funcionalidades), permite um atendimento mais fluído, rápido e de qualidade. Uma diferença muito marcante entre os dois *softwares* de atendimento é que na etapa de pagamento do SIFARMA 2000®, caso o utente mudasse de ideias e quisesse ou não adquirir algum produto ou acrescentar mais algum, já não era possível voltar atrás no processo, enquanto, no novo módulo de atendimento, é possível retroceder e desfazer as ações requisitadas pelo utente, mesmo que já no passo do pagamento.

3.3.2. Pandemia COVID-19

O início do estágio em janeiro deste ano foi marcado pelo recomeço de um segundo confinamento causado pela pandemia COVID-19.

Para além da vantagem económica para a farmácia, na venda de soluções antissépticas de base alcoólica, medicamentos antipiréticos e equipamentos de proteção individual (EPI), a valorização do profissional de saúde também abrangeu as farmácias, não só do ponto de vista técnico, mas também pela sua ação de proximidade com a comunidade tendo um papel preponderante na saúde pública tanto a nível de saúde física como mental.

O estado de preocupação, de dúvida e de angústia que um novo confinamento causou na comunidade, sentia-se na farmácia. As pessoas tinham as suas saídas de casa limitadas e a ida à farmácia era o ponto alto da semana para muitos utentes. Senti, durante o estágio, que a relação entre o farmacêutico e o utente foi fortalecida pois todas as questões que eram levantadas acerca de toda a situação pandémica, o utente usava a sua ida à farmácia, para as colocar ao farmacêutico. Sem esquecer os momentos de desabafo e de partilha de inseguranças que ocorreram comigo, mais uma vez demonstrando a confiança que é depositada no profissional do outro lado do balcão. Muitos utentes vivem sozinhos, e o contacto humano (mesmo que à distância) era uma mais-valia para estas pessoas e um gesto de empatia faz a diferença. E acredito que a pandemia tenha levado a que os utentes reconheçam a farmácia como um lugar seguro com profissionais empáticos e disponíveis.

3.4. **Ameaças**

3.4.1. Número de organismos/seguradoras ou diferentes procedimentos para diferentes organismos

Aquando de um atendimento era necessário atribuir um organismo ou uma seguradora, gerava-se alguma confusão. Foi-me transmitido que com os anos e experiência, este aspeto

torna-se automático, mas quando surgia alguma seguradora diferente do habitual, havia procedimentos que geravam dúvida a todos, e não só a mim. O sistema de comparticipação por organismos e seguradoras não é intuitivo, sendo que algum erro pode levar à não devolução do gasto gerado pelo utente. Portanto, o sistema complexo de processamento de organismos/seguradoras torna, por vezes, os atendimentos lentos pelas questões que levanta (necessidade de confirmação com pessoal do *back-office*) perdendo-se assim a fluidez e otimização de tempo dos atendimentos.

3.4.2. Pandemia COVID-19

A FR apresenta acrílicos em cada balcão de atendimento para prevenir a disseminação do vírus SARS-Cov-2, juntamente com o uso de outros EPI: todos os colaboradores utilizavam uma máscara cirúrgica. Devido a estes impedimentos de propagação do som, e a impossibilidade de leitura de lábios para o completo entendimento interpessoal, haviam muitas falhas de comunicação entre farmacêutico-utente. Senti que o que era transmitido ao utente nem sempre era ouvido ou bem compreendido, assim como as dúvidas e informações relevantes ditas pelo utente eram muito difíceis de entender.

As barreiras na comunicação causadas pela pandemia podem provocar falhas na adesão à terapêutica de forma não intencional por carência de entendimento de ambos os lados.

Também a falta de contacto físico pode ter impacto na relação farmacêutico-utente, pois em situações mais delicadas, geralmente do foro psicológico, o simples conforto de um toque na mão do utente transmite apoio e empatia e, desde o início da pandemia, que este género de relação é afetado por razões sanitárias.

4. CASOS PRÁTICOS

A partir do momento que iniciei o atendimento, comecei a jornada de aplicar conhecimentos adquiridos em várias Unidades Curriculares do MICF nas quais tinham sido exploradas, de uma forma teórica o aconselhamento e indicação farmacêuticas e dermocosméticas.

Apresentam-se de seguida 3 casos concretos de aconselhamento, dos inúmeros que surgiram durante o estágio na FR.

Caso-Prático 1

Um senhor adulto, com aproximadamente 30 anos, de nacionalidade não portuguesa, aponta para a boca a afirmar “*pain, pain*”. Depreendi que se tratava de uma dor de dentes pelo local em que o utente se queixava com dores. Após o entendimento, perguntei se o utente já tinha consultado um Médico-Dentista, sendo que a resposta foi negativa, acompanhada pela expressão “*need something to work*”. O que entendi era que o utente queria uma solução rápida, um comprimido, (o doente também ia dizendo “*a pill*”) que o possibilitasse a retoma ao trabalho porque “não podia parar de trabalhar”.

Concluí que o melhor era aconselhar a marcação de uma consulta no médico-dentista (podendo ser algo grave) e que até ao momento da consulta (para que conseguisse trabalhar) o utente poderia utilizar o Dentispray[®], um MNSRM que se trata de uma solução gengival de benzocaína que tem uma ação anestésica. Aconselhei uma pulverização 3 vezes por dia e falei de algumas precauções a ter: não ingerir líquidos logo a seguir à colocação do *spray* para não haver risco de ingestão e como o efeito de dormência torna perigoso a mastigação por risco de engasgamento ou mordidas da língua/bochecha, aconselhei também a ingestão de alimentos antes da aplicação do *spray* e após a dormência desaparecer.

Frisei ainda, após todo o atendimento, que lhe estava a entregar uma solução temporária e que era extremamente importante que consultasse o médico-dentista.

Caso-Prático 2

Uma senhora com cerca de trinta anos afirma que está com “pingo no nariz” e “farta de espirrar” e que já lhe “arde” a zona perinasal pelo ato de se assoar. Acrescentou ainda que “não apanhou frio” e que não percebia “como poderia estar constipada”.

Fiz algumas questões à utente para perceber se se tratava de uma constipação ou de uma reação alérgica. Perguntei se sentia mais algum sintoma, por exemplo dor de cabeça e se esteve

em contacto com correntes de ar e a senhora disse que não e que mesmo quando ia “caminhar para o pinhal de manhã”, ia “bem agasalhada”. Quando lhe perguntei se tinha alguma alergia, a senhora afirmou que não. No entanto, estávamos no momento das alergias da Primavera e no concelho da Marinha Grande existe uma grande incidência de alergias devido ao pólen proveniente dos pinheiros do Pinhal de Leiria, local que a senhora tinha dito que ia fazer caminhadas.

Perguntei se a utente já tinha alguma terapêutica, ao que me disse que não e depois questionei a preferência por toma de comprimidos ou *spray* nasal e após a demonstração de preferência por comprimidos, aconselhei um MNSRM, anti-histamínico de 2ª geração: cetirizina 10mg. Devido à aflição demonstrada pela utente, aconselhei também a toma de um comprimido quando chegasse a casa para começar o alívio dos sintomas. Acrescentei que mudasse de itinerário nas caminhadas para um local onde não estivesse tão exposta ao alérgico.

Caso-Prático 3

Uma senhora dirige-se à farmácia para saber se deveria “levar o filho à dermatologista porque ele está a entrar na puberdade e está a começar a ter borbulhas e pele oleosa”. Após esta afirmação perguntei a rotina de limpeza da pele que o filho praticava ao que me foi respondido que não tinha nenhuma rotina em específico. Tranquilei que em grande parte das vezes a acne pode ser controlado com produtos cosméticos mas em caso de agravamento já seria necessário recorrer a terapêuticas medicamentosas e aí sim, consultar um dermatologista para o efeito.

A utente demonstrou interesse em iniciar uma rotina no filho e eu sugeri iniciar pela limpeza e hidratação para peles com tendência acneica da gama Effaclar da marca La Roche Posay® por escolha da utente: Gel Mousse de Limpeza da gama Effaclar e Hidratante de Rosto Matificante da mesma gama. Aconselhei a lavagem do rosto com o gel de manhã e à noite e iniciar a colocação do hidratante de seguida. Acrescentei ainda para a importância do protetor solar para evitar que a acne deixe marcas.⁵

5. CONCLUSÃO

Ao colocar todo o meu EC na FR em retrospectiva, é imediatamente constatável que vivi uma experiência marcante para o meu percurso profissional mas principalmente para o meu percurso pessoal. O convívio com o público é tão desafiante e gratificante quanto eu esperava e os momentos de empatia, calma, assertividade que são necessários na profissão de farmacêutico numa farmácia comunitária, só se aprendem experienciando o EC.

Esta experiência é também importante para a integração dos conhecimentos adquiridos ao longo dos anos no MICF que só se tornam palpáveis no EC, daí ser imprescindível a realização do mesmo para a conclusão do curso.

Posso então concluir que a FR me proporcionou um EC que permitiu que ganhasse noções da importância do farmacêutico na comunidade. Ofereceu-me um leque de competências (relacionais, organizacionais e emocionais) e estou muito grata à equipa da FR por todo o cuidado e amizade que me dedicaram ao longo destes 4 meses.

REFERÊNCIAS

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS. - **A Farmácia Comunitária**. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/> (Acedido em 22 de maio de 2021).
2. CENTRO DE INFORMAÇÃO DO MEDICAMENTO E INTERVENÇÕES EM SAÚDE. - **Plano de Contingência COVID-19** - Disponível em https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/editor2/covid_19/planos/PlanoFC.pdf (Acedido em 22 de maio de 2021).
3. ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DO SISTEMA DE SAÚDE, IP (ACSS). - **Manual de Relacionamento das Farmácias com o Centro de Conferência de Faturas do SNS**. (2015). Disponível em: https://ccmsns.min-saude.pt/wp-content/uploads/2019/03/Manual-de-Relacionamento-de-Farm%C3%A1cias_v1.16.pdf (Acedido em 22 de maio de 2021).
4. INSTITUTO NACIONAL DA FARMÁCIA E DO MEDICAMENTO (INFARMED) - **Medicamentos manipulados**. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/inspecao-medicamentos/medicamentos-manipulados> (Acedido em 13 de setembro de 2021).
5. **Effaclar: Para Pele Oleosa propensa a Acne | La Roche-Posay**. Disponível em : https://www.laroche-posay.pt/effaclar?gclid=Cj0KCQjwtrSLBhCLARIsACh6Rmgvyh24tfnYr2DDjZDU7060meK33NU4SITmzWwIY5-RvPZdZGzg98QaAvGuEALw_wcB&gclsrc=aw.ds (Acedido a 18 de outubro de 2021).

PARTE II

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Laboratórios Expanscience

Sob orientação da Dra. Sandra Palma

ABREVIATURAS

DM: Dispositivo Médico

INFARMED: Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

LE: Laboratórios Expanscience

PC: Produto Cosmético

RDM: Regulamento dos Dispositivos Médicos

SIDM: Sistema de Informação para Dispositivos Médicos

SWOT: *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

I. INTRODUÇÃO

No âmbito do estágio curricular em Indústria Farmacêutica, parte integrante do plano de estudos do Mestrado Integrado de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, apresento o relatório de estágio que descreve essa mesma jornada.

O estágio nos Laboratórios Expanscience (LE) foi iniciado a 4 de maio e terminou a 29 de julho com uma soma de 400 horas realizadas sob a orientação da Dra. Sandra Palma e restantes colaboradores dos LE. Durante este tempo tive a oportunidade de contactar com diferentes realidades e diferentes setores dentro da empresa.

Escolhi ter um estágio em Indústria Farmacêutica pelo interesse adquirido através das visitas de estudo realizadas no âmbito das unidades curriculares de Tecnologia Farmacêutica II e III e das aulas da unidade curricular de Comunicação e Marketing Farmacêutico. É uma área de extrema relevância para a população, e que alberga farmacêuticos nos mais diversos setores: na Investigação e Desenvolvimento, no Controlo de Qualidade, nos Ensaio Clínicos, no *Marketing*, nos Assuntos Regulamentares, na Produção, na Formação e tantos outros.

Nos LE, mais concretamente na filial portuguesa, estive ao encargo de duas farmacêuticas: a minha tutora, Dra. Sandra Palma, Diretora Técnica e responsável pelos departamentos de Assuntos Regulamentares e Formação dos LE e com a Dra. Joana Soares, responsável pelo departamento de *Marketing* dos LE. Não esquecendo também, que tive a oportunidade de contactar com pessoal de outros departamentos e com as mais diversas funções: Apoio ao Cliente, Vendas, Delegado de Informação Médica, *Merchandising* e Logística. Tudo isto contribuiu para o enriquecimento do meu conhecimento (que até à data era quase inexistente) acerca dos departamentos numa indústria farmacêutica e a importância de cada um deles.

O meu percurso neste estágio vai ser apresentado sob a forma de análise SWOT (acrónimo que significa *Strengths*, *Weaknesses*, *Opportunities* e *Threats*, que pode ser traduzido em português para Pontos Fortes, Pontos Fracos, Oportunidades e Ameaças) onde demonstro os pontos fortes e fracos do estágio, tais como as oportunidades e ameaças que percecionei ao longo destes 3 meses.

2. LABORATÓRIOS EXPANSCIENCE

Os LE são um laboratório farmacêutico e dermocosmético francês independente que tem vindo a conceber e a produzir e ingredientes ativos de origem natural e produtos inovadores destinados à osteoartrite e à saúde da pele. O departamento de investigação e desenvolvimento, tal como o de manufatura dos produtos, restringem-se a um único local em Epernon, a Sul de Paris.¹

Os LE são detentores da Mustela® que é atualmente a marca líder no segmento de bebés na Europa e, para além disso, foram o primeiro laboratório dermocosmético francês a ser certificado como Bcorp, uma certificação que comprova o compromisso da empresa em manter um impacto positivo no meio ambiente, na comunidade, nos colaboradores e nos clientes. O movimento Bcorp tem como ideal que “todas as empresas se comprometam a ser as melhores para o mundo”.²

O compromisso da empresa em termos de Responsabilidade Social e Empresarial foi reconhecida pelo nível de “Exemplar”, os LE são membros da União para o Biocomércio Ético e todos os novos produtos Mustela® são concebidos de forma ecológica, comprovando o empenho dos LE no cumprimento dos seus compromissos.³

Fundados em 1950, os LE empregam mais de 1000 pessoas e têm 14 filiais em todo o mundo. Uma dessas filiais encontra-se em Portugal desde 1977, a filial onde decorreu o meu estágio curricular na área de Assuntos Regulamentares, Formação e Marketing.⁴

Em Portugal, os LE têm como responsabilidades distribuir cosméticos e dispositivos médicos da casa-mãe (marca Mustela®). Para além disso também são representantes de cosméticos, dispositivos médicos e biocidas de outros laboratórios (Asepta, Batteur e OTC). A filial distribui em Portugal, Angola, Moçambique e Cabo-Verde.

3. ANÁLISE SWOT

Tabela I: Análise SWOT

Internamente		Externamente	
Pontos Fortes	Pontos Fracos	Oportunidades	Ameaças
Contacto com diferentes estatutos de produtos	Inexistência de medicamentos	Desenvolvimento de portal e aplicação. Sales force.	Situação Pandémica
Acompanhamento de várias áreas de trabalho	Coincidência de tempo de estágio com férias da equipa dos LE	Aula na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto	
Colaboradores			
Competências			

3.1. Pontos Fortes

3.1.1. Contacto com diferentes estatutos de produtos

Ao longo do estágio pude contactar com diferentes produtos, começando com alguns produtos cosméticos, cujo mercado é regulado e supervisionado pela Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. (INFARMED).⁵

Produto cosmético (PC) pode ser definido como algo que tem como finalidade de limpar, perfumar, modificar o aspeto, proteger, manter em bom estado ou corrigir odor de qualquer parte externa do nosso organismo, isto é, epiderme, pelos, cabelos, unhas, lábios e partes externas dos órgãos genitais, bem como a mucosa bucal, incluindo os dentes.⁵

Antes de um PC entrar no mercado, ou quando a embalagem do mesmo é alterada, o departamento de Assuntos Regulamentares necessita de verificar que toda a informação necessária está inscrita no rótulo (nome e endereço da pessoa ou empresa responsável, conteúdo nominal, data de durabilidade mínima ou período após abertura, se for menor que 30 meses, número de lote, precauções especiais de utilização, lista de ingredientes), se a tradução está correta e se não são feitas nenhuma alegações não autorizadas ou indevidamente provadas.⁶

Após este primeiro contacto com PC, seguiram-se 3 semanas dedicadas aos Dispositivos Médicos (DM) devido à implementação a 26 de maio do novo Regulamento dos Dispositivos Médicos (UE) 2017/745 (RDM).⁷

Um DM é, segundo o RDM: “qualquer instrumento, aparelho, equipamento, *software*, implante, reagente, material ou outro artigo, destinado pelo fabricante a ser utilizado, isolado ou conjuntamente, em seres humanos” para um fim médico específico e “cujo principal efeito pretendido no corpo humano não seja alcançado por meios farmacológicos, imunológicos ou metabólicos”. Isto é, é um dispositivo que alcança a sua função primária por ação física.⁸

Com a implementação do RDM, foi necessário verificar se os DM que são distribuídos pelos LE se mantinham dentro da legislação que ia entrar em vigor porque, apesar dos DM que têm emitidos certificados segundo a Diretiva 93/42/CEE poderem ser comercializados até 2025, houve algumas mudanças a nível da classificação dos DM e implementação do sistema de identificadores únicos dos dispositivos (UDI) para que seja possível rastrear e aceder a informações básicas acerca dos DM na base de dados europeia sobre DM (EUDAMED).⁹

A Autoridade Competente responsável pela fiscalização do mercado dos dispositivos médicos em Portugal é o INFARMED, I.P.. Para uma gestão mais eficaz e eficiente da informação sobre os DM, foi elaborado pela Autoridade Competente o portal Sistema de Informação para Dispositivos Médicos (SIDM), no qual os respetivos fabricantes, mandatários ou distribuidores têm que inserir os dados obrigatórios expressos pelo RDM.¹⁰

Todas estas mudanças ocorridas durante o meu estágio foram uma mais-valia, pois foi me necessário saber interpretar o novo regulamento e saber formular perguntas acerca do mesmo ao INFARMED e também aprender a dominar o funcionamento do portal SIDM.

Ainda que não tenha tido muito contacto com biocidas, os LE também os contêm no seu portfólio, tratando-se de substância (s) que servem para controlar organismos que de alguma afetam a saúde humana ou animal ou que provocam danos materiais.¹¹

A Autoridade Competente designada para os biocidas de uso não veterinário é a Direção-Geral da Saúde e é a esta que é necessário emitir um pedido de autorização de venda antes da disponibilização de biocidas no mercado nacional.

3.1.2. Acompanhamento de várias áreas de trabalho

Neste estágio eu estava inserida num departamento abrangente. No departamento de Assuntos Regulamentares era necessário conhecer e fazer cumprir os Regulamentos, Diretivas e Decretos de Lei dos respetivos produtos distribuídos pelos LE, mas também executar

procedimentos relativos à Cosmetovigilância, Vigilância de DM e Biocidas e reclamações de Qualidade. No departamento de Formação era necessário planejar as formações dadas pela Dra. Sandra e pelos formadores, *webinars* e realização de conteúdos para formações e outros fins, que está profundamente articulado com o departamento de *Marketing*.

Foi planeado desde o início que eu tivesse uma visão global do funcionamento da empresa e tivesse contacto com grande parte dos departamentos existentes na filial.

O departamento de Formação tem sob a sua responsabilidade os formadores que dão formação aos clientes (farmácias) dos LE e, associado à formação, está aliado o trabalho de *merchandising*. O formador para além de formar as farmácias acerca dos produtos distribuídos pelos LE, também as equipa com materiais promocionais, regletes, vinis e outros, por forma a aumentar a visibilidade das marcas na farmácia e também a tornar os lineares mais apelativos. Acompanhei um dia de trabalho da formadora e responsável de *merchandising* dos LE, onde nesse dia visitámos farmácias e parafarmácias e executámos, essencialmente, tarefas de *merchandising*, como montagem de placards e lineares, sendo que no que toca a formações ainda era tudo executado de forma remota.

Também acompanhei de perto um dia de trabalho do Delegado de Informação Médica dos LE, no qual fizemos uma visita a um consultório médico, a um centro de saúde e a uma maternidade. Nas visitas oferecemos alguns produtos e amostras das marcas Mustela®, Moustidose® e Akileine®, demos algumas informações acerca dos produtos que estivemos a oferecer e questionámos quais os produtos em que os pais/doentes demonstraram mais interesse e quais as amostras mais requisitadas, recebendo assim, de outra forma que não pela avaliação de vendas, um feedback acerca dos produtos. Uma outra responsabilidade na visita às maternidades é o acerto dos protocolos existentes entre a Mustela® Bebé-Criança/Mustela® Maternidade e os hospitais e centros de saúde. Nesses locais são oferecidos aos pais e bebés bolsas de amostras e/ou produtos por forma a dar a conhecer a marca e conseguir a fidelização de clientes logo desde o início do ciclo da maternidade. Reconheci a importância da existência de produtos Mustela® nos consultórios, nos centros de saúde, nos hospitais e da existência de protocolos, porque quando os pais vêm um profissional de saúde a usar e a oferecer algum produto, este produto ganha um reconhecimento e notoriedade que não é possível dar na farmácia.

É de acrescentar também a ligação dos departamentos de Formação, de Assuntos Regulamentares e de *Marketing*. Os materiais, imagens, visuais elaborados pelo *Marketing* e pelas agências de *design* podem ser usados nas formações, apresentações e *webinars* e têm que

ser aprovados pelos Assuntos Regulamentares, principalmente a nível de reivindicações. Também as manipulações feitas aos produtos (isto é, modificações na embalagem para dar a conhecer a promoção do produto. Por exemplo: 2=1) decididas pelo departamento de *Marketing* têm que passar pelos Assuntos Regulamentares porque, no caso dos DM não se pode ocultar informação da embalagem, como é permitido nos cosméticos. Tomei conhecimento das responsabilidades do departamento de *Marketing* pela Dra. Joana Soares, que na ausência da Dra. Sandra, me orientou no estágio e me explicou as suas funções nos LE, desde decisões de orçamentos para cada departamento, decisões de campanhas das marcas, previsões de mercado com recurso ao IQVIA (empresa de utilização de dados do sector da Saúde que avalia o consumo e tendências de medicamentos e produtos), decisões de aquisição de produtos novos para o portfólio dos LE, aprovação de materiais, entre outros.12

Por fim, ao longo dos meus dias no escritório da filial, pude contactar e trocar ideias com colaboradores do Apoio ao Cliente, da Comunicação, do *Marketing* Digital e do departamento de Logística, tudo importante para ganhar a visão global do funcionamento da empresa, vista como objetivo do estágio.

3.1.3. Colaboradores

Apesar do pouco contacto presencial existente (sobre o qual me irei debruçar nas Ameaças, no ponto 3.4.1.), todo o contacto estabelecido com qualquer colaborador da empresa (presencialmente ou por via remota) foi positivo. Toda a equipa me tentou integrar e me tentou fazer sentir “um deles”. Mesmo que por videoconferência, era facilmente perceptível que todos os colaboradores gostavam do trabalho que exerciam, onde o exerciam (nos LE) e com quem o exerciam (os colegas de trabalho). Foi uma inspiração nesse aspeto, porque a envolvência acabava por ser contagiante e senti, de verdade, que a energia positiva acabava por ajudar a um melhor trabalho de equipa, a uma melhor performance individual e a melhores resultados.

A Dra. Sandra Palma foi a maior interveniente na minha integração na equipa e senti uma verdadeira sensação de uma dupla de trabalho de sucesso. Sem esquecer a sua ajuda também na adaptação à cidade de Lisboa, que também é importante quando se vai estagiar num local que, no meu caso, era quase desconhecido para mim.

3.1.4. Competências

Desde o dia um até ao final do estágio, houve uma notória melhoria nas minhas *soft skills*, por tudo o que me foi posto à prova. Um dos exemplos disso mesmo decorreu do facto da

equipa dos LE ser pequena e existirem poucos colaboradores, havendo então acumulação de cargos, como é o caso da minha tutora de estágio. Portanto, logo desde o início apercebi-me que havia muitas tarefas alocadas numa só pessoa, e mesmo havendo entrega total por parte da Dra. Sandra e pela minha parte, certas tarefas teriam que ficar simplesmente para segundo plano. Com isto, foi desenvolvida a capacidade de hierarquização de tarefas, bem como um maior sentido de responsabilidade e maior apetência para resolução de problemas, uma vez que me eram alocadas tarefas que tinha de realizar de autonomamente. Um outro exemplo que contribui para o exponenciar das minhas *soft skills* foi a realização de *webinars*, onde vários colaboradores dos LE exibiam apresentações, sendo um dos momentos onde era explorado o trabalho de equipa e comunicação entre todos, eu incluída, para que os eventos se realizassem de acordo com o esperado.

É importante também mencionar uma experiência de relevo, a qual surgiu quando, nos primeiros dias de estágio, obtive a visão geral dos objetivos do 2º ciclo (o ano é formado por 3 ciclos, sendo que no início do estágio entrei no ciclo que se inicia em maio e termina em agosto) e um deles tinha por base a elaboração de conteúdos para uma aplicação para sistemas operativos *Android* e *iOS* dos LE. A Dra. Sandra desafiou-me a criar um guião acerca de um produto à minha escolha e que eu fosse a apresentadora do vídeo no qual o produto escolhido é caracterizado. Aceitei o desafio e a tarefa ajudou no desenvolvimento das minhas competências de adaptabilidade e de comunicação.

3.2. Pontos Fracos

3.2.1. Não comercialização de medicamentos

Apesar dos LE apresentarem um grande leque de produtos, não apresentam nenhum na categoria de medicamento. Principalmente no departamento de Assuntos Regulamentares, essa existência seria uma mais-valia para a possibilidade de integrar de conhecimentos da Unidade Curricular de Assuntos Regulamentares do Medicamento, relacionados com os pedidos de autorização de introdução no mercado bem como o processo de elaboração ou pedidos de alteração do documento técnico comum do medicamento.

3.2.2. Coincidência de tempo de estágio com férias da equipa dos LE

O meu período de estágio foi muito agradável porque pude vivenciar a cidade de Lisboa nos seus tempos áureos de primavera e de verão, no entanto, a realização do estágio neste período implicou a coincidência do mesmo com momentos de férias dos elementos da equipa dos LE dificultando por vezes o completar de tarefas que não dependiam só de mim. Também

no final do meu estágio a Dra. Sandra esteve no seu período de férias mas isso foi contornado pela Dra. Joana do departamento de *Marketing*, que me guiou nos últimos dias.

3.3. Oportunidades

3.3.1. Desenvolvimento de portal e aplicação. Sales Force

No momento em que se iniciou o meu estágio, o departamento de formação tinha como objetivo de voltar a publicar conteúdos de forma assídua na aplicação móvel (que referi no ponto “3.1.4. Competências”) disponível para telemóveis e *tablets*, destinada aos colaboradores das farmácias: “*Expanscience Academy*”. Com este objetivo surgiu a oportunidade de eu entrar na organização, elaboração de conteúdos e resolução de problemas da aplicação através do *software* que a empresa tinha: o Sales Force. A entrada neste projeto foi algo que gostei particularmente, porque pedia de mim o meu lado mais criativo, para a criação de imagens, slides e questionários acerca dos conteúdos publicados, para além de que também me ajudou a conhecer mais aprofundadamente os produtos dos LE.

Um outro projeto no qual tive a oportunidade de participar foi na preparação de um portal web (<https://academia.expanscience.pt/>), juntamente com a Dra. Sandra e com uma agência, com a finalidade de iniciar um ciclo de *webinars* acerca de temas que envolviam os alicerces e propósitos da empresa a nível da sustentabilidade, tal como os produtos do portfólio dos LE. Os *webinars* eram destinados isoladamente para farmácias, para consumidores finais, ou para enfermeiros, ficando a possibilidade de realização dos mesmos para pediatras e podologistas como objetivo futuro.

Em ambos os projetos foi necessário, por um processo de tentativa e erro, da minha parte e da Dra. Sandra, aprender a colocar os visuais nas plataforma e a redigir *emails* para milhares de pessoas a promover as plataformas e, no caso dos *webinars*, aprender também a realizá-los.

3.3.2. Aula na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Apesar da situação pandémica, foi possível concretizar algo que é prática recorrente da Dra. Sandra com a Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, uma aula acerca do percurso da minha tutora e de alguns produtos de cosmética Mustela®. Foi algo semelhante ao que acontece na Unidade Curricular de Dermofarmácia e Cosmética e foi bom perceber a aula não como aluna, mas como aprendiz, apreciando o desenrolar da apresentação e entendendo que pontos são mais interessantes de referir consoante a audiência.

3.4. Ameaças

3.4.1. Situação Pandémica

Pela situação pandémica, o trabalho remoto era aconselhado, se não, quase obrigatório, o que levou a que o contacto com a Dra. Sandra fosse feito quase exclusivamente por via digital, e que não me fosse possível conhecer todos os colaboradores da empresa, pelo menos os que trabalham no escritório. Apesar disso, foi possível estagiar a maioria dos dias no escritório (mesmo que sozinha, mantendo a comunicação por via *Microsoft Teams*) e ir conhecendo as pessoas que se iam deslocando, ao longo da semana, às instalações. No entanto, não foi possível desenvolver uma relação que, doutra forma, ao conviver diariamente, talvez fosse possível desenvolver. O ambiente acolhedor e a receção nos escritórios que ansiava não foram os que costumam ser em comparação com anos passados, antes da pandemia, mas o esforço da equipa para me integrar não passou despercebido. Também é de salientar que esta situação teve como aspeto positivo o desenvolvimento de competências ao nível do *Microsoft Teams*, a plataforma preferencial de comunicação remota entre membros de equipa, onde aprendi a marcar reuniões e a gerir *webinars*.

Infelizmente, estava programado uma visita à Dilofar, (empresa de logística e de distribuição subcontratada para fazer a distribuição dos produtos dos LE, em Portugal continental) e esta também não foi possível. A visita à Associação dos Industriais de Cosmética, Perfumaria e Higiene Corporal, organismo representante da indústria dermocosmética em Portugal, também não foi realizável, mas conseguiu-se agendar uma reunião por via remota com a Engenheira Ana Maria Couras, sendo que o tema se prendeu na mudança de regulamento dos PC no futuro, que terá em conta a tendência da sustentabilidade e naturalidade dos produtos cosméticos e as suas novas reivindicações.

4. CONCLUSÃO

Ser *trainee* no departamento de Assuntos Regulamentares e de Formação nos LE, sob a orientação da Dra. Sandra Palma, foi uma verdadeira honra. Senti-me sortuda durante estes três meses e embarquei no projeto com toda a vontade de aprender. E assim foi, aprendi e ganhei noções de como a Indústria Farmacêutica e Dermocossmética operam, e como funcionam os principais departamentos da mesma. Para além disso, fui inserida no seio de uma empresa com um ambiente invejável, no qual me senti extremamente motivada mas ao mesmo tempo desafiada pela equipa competente. Foi uma experiência definitivamente enriquecedora a nível curricular e pessoal.

REFERÊNCIAS

1. LABORATOIRES EXPANSCIENCE. - **Laboratoires Expanscience**. Disponível em: <https://www.expanscience.com/en/expanscience/company> (Acedido em 24 de junho de 2021).
2. B CORPORATION. - **Portugal | Certified B Corporation**. Disponível em: <https://bcorporation.eu/about-b-lab/country-partner/portugal> (Acedido em 1 de julho de 2021).
3. LABORATOIRES EXPANSCIENCE. - **Compromissos**. Disponível em: <https://www.expanscience.pt/compromissos> (Acedido em 12 de julho de 2021).
4. **Laboratórios Expanscience - Produtos De Higiene, Sociedade Unipessoal, Lda. Company Profile**. Disponível em: https://www.dnb.com/business-directory/company-profiles.LABORATÓRIOS_EXPANSCIENCE_-_PRODUTOS_DE_HIGIENE_SOCIEDADE_UNIPESSOAL_LDA.8972eb74db590f2d337638e190dd2a95.html (Acedido em 24 de junho de 2021).
5. INSTITUTO NACIONAL DA FARMÁCIA E DO MEDICAMENTO (INFARMED). - **Cosméticos**. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/cosmeticos> (Acedido em 1 de julho de 2021).
6. PARLAMENTO E CONSELHO EUROPEU. - **Regulamento (UE) N.º 528/2012**. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/HTML/?uri=CELEX:32012R0528&from=PTn> (Acedido em 1 de julho de 2021).
7. INSTITUTO NACIONAL DA FARMÁCIA E DO MEDICAMENTO (INFARMED). - **Implementação dos novos regulamentos de DM e DIV**. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/implementacao-dos-novos-regulamentos-de-dm-e-div> (Acedido em 1 de julho de 2021).
8. PARLAMENTO E CONSELHO EUROPEU. - **Regulamento dos Dispositivos Médicos (UE) 2017/745 (RDM)**. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/HTML/?uri=CELEX:32017R0745&from=PT> (Acedido em 1 de julho de 2021).
9. UNIÃO EUROPEIA. - **Ficha informativa para mandatários, importadores e distribuidores de dispositivos médicos e de dispositivos médicos para diagnóstico in vitro**. Disponível em: https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/md_newregulations/docs/importersdistributors_factsheet_pt.pdf (Acedido em 1 de julho de 2021).

10. INSTITUTO NACIONAL DA FARMÁCIA E DO MEDICAMENTO (INFARMED). - **SIDM**. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/SIDM-fo/> (Acedido em 1 de julho de 2021).
11. PARLAMENTO EUROPEU & CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA. - **Regulamento (UE) N.º 528/2012**. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/HTML/?uri=CELEX:32012R0528&from=PT> (Acedido em 2 de julho de 2021).
12. IQVIA. - **IQVIA Portugal**. Disponível em: <https://www.iqvia.com/pt-pt/locations/portugal> (Acedido a 5 de setembro de 2021).

PARTE III

Monografia

“Nanopartículas Lipídicas como Sistemas de Entrega de Macromoléculas”

Sob orientação do Professor Doutor João Nuno Sereno de Almeida Moreira

RESUMO

No contexto de doenças com poucas expectativas nas soluções que as terapias convencionais oferecem, a terapia génica tem demonstrado ser a luz ao fundo do túnel através da entrega de macromoléculas capazes de silenciar genes cuja expressão desregulada se traduz numa patologia ou expressar proteínas terapêuticas ou até macromoléculas com capacidade de correção genética.

Devido às inúmeras limitações dos vetores virais, os vetores não virais ganham maior notoriedade por garantir uma maior segurança. Um dos sistemas de entrega mais promissores são as Nanopartículas Lipídicas (NPL) por serem dos vetores não virais que demonstram ser o indicado para a entrega de macromoléculas como ácidos nucleicos e complexos de enzimas de edição de genes.

A presente revisão inicia-se com as características que as NPL deverão apresentar, como os desafios que este sistema enfrenta para ser considerado um sistema de entrega de sucesso no transporte de ácidos nucleicos de forma íntegra. São apresentadas então duas soluções terapêuticas atuais que recorrem a esta tecnologia (caso do Onpattro® e das vacinas contra o SARS-CoV-2), também como outras investigações, relacionadas com o CRISPR/Cas9, que estão a ser desenvolvidas no momento.

Palavras-chave: nanopartículas lipídicas, sistema de entrega, vetores não-virais, terapia génica, ácidos nucleicos, CRISPR/Cas9.

ABSTRACT

In the context of diseases associated with unmet medical need with low expectations in the solutions offered by conventional therapies, gene therapy has proven to be the light at the end of the tunnel by delivering macromolecules capable of silencing pathological genes or expressing therapeutic proteins or even macromolecules with genetic correction capacity.

Due to the numerous limitations of viral vectors, non-viral vectors are gaining greater notoriety associated with the underlying safety and efficacy. One of the most promising delivery systems are Lipid Nanoparticles (LNPs) as they are one of the non-viral vectors that have demonstrated to be suitable for the delivery of macromolecules such as nucleic acids and gene editing enzymes complexes.

This review begins with the characteristics that NPLs should exhibit, such as the challenges that this system faces to be considered a successful delivery system for transporting nucleic acids in its intact form. Two current therapeutic solutions using this technology (Onpattro® and SARS-CoV-2 vaccines) are then presented, as well as other CRISPR/Cas9-related research currently under development.

Keywords: lipid nanoparticles, delivery system, non-viral vectors, gene therapy, nucleic acids, CRISPR/Cas9.

ABREVIATURAS

Cas: endonucleases associada ao CRISPR

CRISPR: Repetições palindrómicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas

DSB: Quebra da cadeia dupla de DNA

DLinDMA: 1,2-dilinoiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano

DLin-MC3-DMA: Heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il-4-(dimetilamino)-butanoato

DODAP: 1,2-dioleoil-3-dimetilamónio propano

DOPE: Dioleilfosfatidiletanolamina

DOTMA: N-[1-(2,3-dioleiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamónio

DSPC: Distearoilfosfatidilcolina

hATTR: Amiloidose hereditária associada à Transtirretina

HDR: Reparação dirigida homologamente

LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade

miRNA: MicroRNA

mRNA: RNA mensageiro

NHEJ: Junção final não homóloga

NPL: Nanopartículas Lipídicas

PAM: *protospacer-adjacent motif*

PEG: Polietilenoglicol

RISC: Complexo de silenciamento induzido pelo RNA

RNP: ribonucleoproteína

S: Glicoproteína *spike*

sgRNA: guia único de RNA

siRNA: RNA de interferência de cadeia pequena

SORT: *Selective ORgan Targeting*

TALEN: Nuclease Efetor Semelhante a Ativador de Transcrição

ZFN: Nuclease de Dedo de Zinco

I. INTRODUÇÃO

Há quase 50 anos atrás, foi proposto que DNA exógeno poderia ser a resposta que se procurava para solucionar o problema de doenças hereditárias. Começou assim a estratégia de usar terapia gênica para atingir o tratamento de doenças para as quais havia pouca probabilidade deste ser atingido através dos métodos convencionais.¹⁻³

A terapia gênica pode ser entendida então, como uma nova técnica de prevenir, aliviar, compensar ou corrigir doenças relacionadas com genes (doenças genéticas, cancro, doenças infecciosas, cardiovasculares, etc.) através da correção de defeitos nos genes, expressão de produtos genéticos terapêuticos ou inativação de genes patogênicos.^{1,3,4}

Os ácidos nucleicos, como biopolímeros altamente hidrofílicos e com carga negativa, são dos melhores candidatos para a terapia gênica mas devido às suas características e rápida hidrólise por nucleases, necessitam de um sistema de entrega sofisticado que altere a identidade fisicoquímica e farmacocinética intrínseca dos ácidos nucleicos até estes atingirem o alvo terapêutico.⁵

O vetor ideal deverá ser específico para as células alvo, ter facilidade a entrar nas células, ter capacidade de expressar o produto terapêutico, ser seguro, proporcionar a expressão desejada continuamente e deverá ser de fácil produção em larga escala. Existem duas categorias de vetores: virais e não-virais.⁶

Primeiramente, a terapia gênica recorria a vírus inativados como vetores virais, com genes clonados num plasmídeo, que codificam proteínas potencialmente terapêuticas as quais infetariam o núcleo da célula e que expressaria então a proteína desejada. Os adenovírus, os retrovírus e os vírus adeno-associados são os vetores virais mais frequentemente utilizados em ensaios clínicos para este efeito.²

Com o passar dos anos descobriram-se vários problemas em relação aos vetores virais: inadequação para a transferência de genes de tamanho considerável, dificuldade e custo de produção destes vetores, potencial patogenicidade, possibilidade de gerar uma resposta imune e, por consequência, inativação dos vetores virais ou destruição das células infetadas, bem como toxicidade que pode ocorrer por ativação da resposta inflamatória ou até por ativação de oncogenes (que podem ser os desencadeadores de malignidades).^{1,2,4,6}

Com estas falhas em mente, começou a investigação em torno da ideia de sistemas de entrega de genes terapêuticos sem a utilização de agentes infecciosos para o efeito, iniciando-se assim a exploração dos vetores não-virais.²

Existem vários tipos de nanopartículas que estão disponíveis para serem usadas como vetores não-virais. Tais como nanopartículas de sílica, nanotubos de carbono, polímeros, nanopartículas de ouro e nanopartículas lipídicas (NPL).⁷

Estas últimas são consideradas os principais sistemas que permitem atingir o potencial clínico de ácidos nucleicos,⁸ razão pela qual a presente revisão incide sobre os sistemas de entrega de macromoléculas a partir de NPL.

2. NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

As NPL são cápsulas com um núcleo aquoso, oleoso, sólido ou amorfo, estabilizado por camadas lipídicas com dimensões entre os 10 e 1000 nanômetros e os sistemas de entrega nanoparticulados são sistemas que encapsulam, conjugam ou adsorvem o fármaco graças à composição da sua matriz.^{9,10}

Os vetores não-virais, como as NPL, têm o potencial de ter uma maior carga de material genético, têm tendência a ter menor imunogenicidade que os vetores virais e são tipicamente mais fáceis de sintetizar. No entanto, têm uma menor eficiência de entrega em comparação com os vírus, que têm evoluído ao longo dos tempos, e dessa forma têm melhorado a transmissão dos seus genomas às células de mamífero, conseguindo ultrapassar as múltiplas barreiras que estas apresentam.⁶

As barreiras que as NPL têm de atravessar para a entrega sistémica podem ser divididas por duas categorias: extracelulares e intracelulares (Figura 1). As barreiras extracelulares são as que são necessárias de ultrapassar antes de atingir a célula alvo, tais como a barreira provocada fisiologicamente pelos mecanismos de *clearance* do fígado, rim e baço, mas também é necessário evitar a ativação das endonucleases séricas pela opsonização das NPL e a ativação do sistema imune. Por forma a migrar pelo espaço extracelular para atingir a célula alvo, é também essencial que as NPL sofram extravasão do vaso sanguíneo. Na abordagem da terapia génica às doenças neurodegenerativas, uma outra barreira a ter em conta é a barreira hematoencefálica. Após a superação destes obstáculos, as NPL deparam-se com as barreiras intracelulares. A primeira é a passagem pela membrana plasmática até ao citoplasma. Geralmente, as NPL são internalizadas pela via da endocitose, sendo que nesse caso, o objetivo das NPL é o escape, pois ou as NPL sofrem exocitose, ou o endossoma formado irá maturar até lisossoma, diminuir no seu interior o seu pH e ativar assim enzimas de degradação. No entanto, mesmo após o escape, existem no citoplasma barreiras a contornar, como as nucleases citoplasmáticas, a autofagia, a descomplexação das NPL e libertação da sua carga e por fim, se o local de ação da macromolécula for no núcleo, é necessário ultrapassar a membrana nuclear.^{6,11}

Devido às características dos lípidos, como biocompatibilidade com o organismo, a biodegradabilidade e adequabilidade à produção de larga-escala, os sistemas de entrega baseados em NPL são preferíveis em comparação às nanopartículas poliméricas.⁹

Nos anos 80 começou-se a propor os lipossomas (sistemas de bicamada lipídica de substâncias anfífilas, geralmente fosfolípidos) como um veículo válido de entrega de fármacos

em forma de pequenas moléculas, e apesar de naquela época não se conseguir atingir um alvo específico com os lipossomas, já se associavam grandes benefícios a este método devido à possibilidade de se controlar o tamanho do sistema através do processo de preparação e se manter ou aumentar a eficácia, mas com menor toxicidade do fármaco.^{12,13}

O primeiro fármaco lipossomal a ser autorizado foi o *AmBisome*[®], em 1990 na Europa, indicado para infeções sistémicas de fungos suscetíveis à anfotericina B. *AmBisome*[®] é um pequeno lipossoma unilamelar que contém a anfotericina B na bicamada lipídica, devido às características hidrofóbicas da molécula. Por este método de entrega, o *AmBisome*[®] consegue uma menor nefrotoxicidade e um pico sérico mais elevado que a anfotericina B, sem perder a atividade antifúngica sistémica.^{8,14,15}

Um outro sistema lipossomal a ser autorizado pela autoridade regulamentar americana foi o *Doxil*[®], com indicação para o tratamento do Sarcoma de Kaposi. Este fármaco contém doxorubicina encapsulada num nano-lipossoma cujo revestimento inclui metoxipoli(etilenoglicol). Este sistema PEGuilado permite a diminuição da toxicidade associada à doxorubicina (mielossupressão, toxicidade gastrointestinal, etc.) mantendo o efeito antitumoral da molécula, devido ao efeito de maior retenção e penetração associado às NPL. (em inglês: “*enhanced penetration and retention effect*”).^{8,12,16}

Também na década de 80, desenvolveram-se outros produtos lipossómicos, tais como vacinas e agentes de contraste, de entre os quais se destaca a vacina *Epaxal*[®], uma vacina para a hepatite A. Esta vacina é composta por virossomas, que se trata do vírus da hepatite A inativado por formaldeído e adsorvido numa membrana lipossomal de fosfolípidos, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, formando partículas de diâmetros de acerca 150 nanómetros.^{10,17}

Existem vários medicamentos, com base em lipossomas, autorizados pelas autoridades reguladoras mas a maior parte deles contém pequenas moléculas. Esse tema já está relativamente bem posicionado, enquanto o segmento das NPL para a entrega de macromoléculas no contexto de terapia génica ainda tem muito por descobrir.⁸

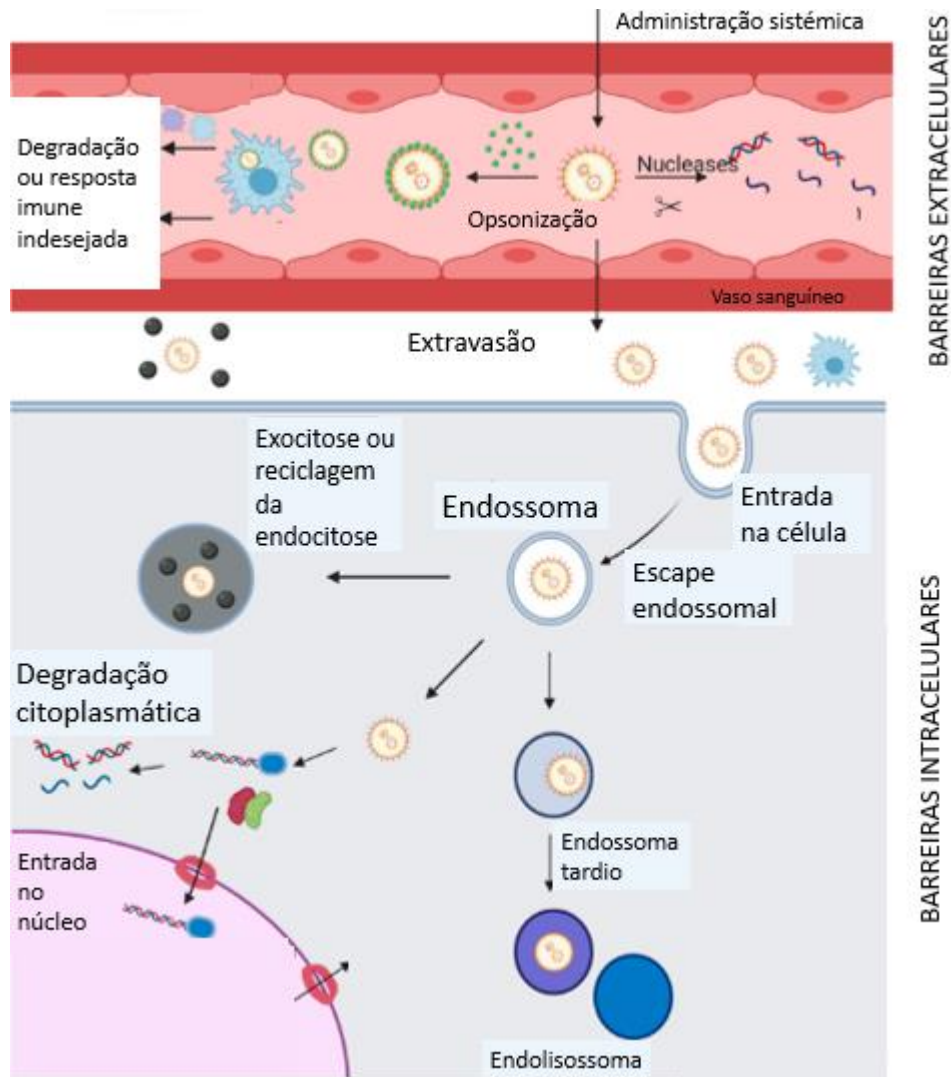


Figura 1. As barreiras biológicas dos sistemas de entrega não-virais na terapia gênica. Após a administração sistêmica, o vetor não-viral pode deparar-se com barreiras extracelulares (opsonização, degradação por nucleases séricas, ativação sistema imune) e após extravasão do vaso sanguíneo e endocitose para o interior da célula alvo, existem as barreiras intracelulares (escape do endossoma para evitar a evolução até endolisossoma e degradação do respetivo conteúdo, exocitose, degradação citoplasmática). Se o local de ação do ácido nucleico for no núcleo, ainda é primordial superar a membrana nuclear por forma a entrar no núcleo. *Adaptado de* ¹¹

3. NPL COMO SISTEMA DE ENTREGA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.1. Ácidos Nucleicos

Ácidos nucleicos são estruturas orgânicas lineares de nucleótidos. Estes elementos são compostos por uma base heterocíclica nitrogenada, uma pentose e um grupo fosfato que confere aos ácidos nucleicos o carácter aniónico. São hidrossolúveis e absorvem no comprimento de onda máximo de 260 nm.^{5,18-20}

O DNA e o RNA enquanto fármacos, partilham o mesmo mecanismo de ação: reconhecimento específico de sequências de ácidos nucleicos através da complementaridade de bases por *Watson-Crick*.¹⁹

Outros ácidos nucleicos usados na terapia génica são: oligonucleótidos *antissense* que são cadeias simples, sintéticas e curtas de DNA ou RNA. São desenhadas para que reconheçam uma determinada sequência de RNA mensageiro (mRNA) por forma a perturbar a expressão desse respetivo gene, inibindo a síntese proteica. Os microRNA (miRNA) são RNA de cadeia simples, sequências curtas, não codificantes, que principalmente regulam a expressão génica na fase de pós-transcrição. O miRNA, juntamente com a proteína Argonaute, forma o complexo *RNA-induced silencing complex* (RISC) que regula a expressão génica, por exemplo ao reprimir a tradução do mRNA por diversos mecanismos. Já o RNA de interferência de cadeia curta (*short interfering RNA* em inglês, siRNA) é RNA de cadeia dupla, não codificante, que ao ligar-se ao RISC desencadeia a supressão de um gene específico.¹⁹⁻²²

Os ácidos nucleicos também são uma ferramenta indispensável, por exemplo, como ferramentas de diagnóstico comuns: o *Micro Arrays*, uma ferramenta de diagnóstico e prognóstico molecular que deteta a expressão de milhares de genes simultaneamente. Para executar esta análise, são usadas duas amostras de DNA complementar: uma de referência e outra experimental. Cada amostra é marcada com uma sonda fluorescente diferente e hibridizada com as sondas de DNA da placa. Assim é possível observar quais os genes sobreexpressos pela cor que cada poço correspondente apresenta, permitindo gerar um perfil genético e demonstrar mudanças na expressão de genes decorrentes de tratamentos ou doenças.^{23,24}

Uma outra ferramenta de diagnóstico, que nos dias de hoje já é conhecida por todos, é a Transcrição Reversa- Reação em Cadeia por Polimerase em Tempo Real (*Real Time Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction* em inglês). É um método específico e sensível para a amplificação, deteção molecular e quantificação de ácidos nucleicos. Tem várias aplicações, mas a de maior impacto na atualidade será a de deteção de RNA do vírus SARS-CoV-2 em amostras biológicas provenientes da nasofaringe. São usadas sondas marcadas com um fluoróforo, complementares a zonas específicas do genoma viral. Se a amostra contiver material genético do SARS-CoV-2, este irá ser amplificado e detetado.^{25,26}

A utilização de ácidos nucleicos como fármaco já se encontra implementada, sendo que o primeiro medicamento de ácidos nucleicos a ser aprovado foi o Vitravene[®]: uma injeção intravitreal de fomiversen, que é um oligonucleótido *antissense* de DNA que inibe a replicação

do citomegalovírus e foi autorizado para doentes com o sistema imune comprometido e que sofriam de retinite causada por esse vírus. Este oligonucleótido tem complementaridade com uma região específica do transcriptoma do vírus que é essencial para a sua replicação e adsorção nas células hospedeiras e que não afeta a expressão génica do humano. Foi retirado voluntariamente em 2002 do mercado pelo titular da autorização de comercialização, na Europa, por questões económicas e não por questões de segurança.^{19,21,22,27}

Já as primeiras encapsulações de ácidos nucleicos em lipossomas datam de finais dos anos 70. Dimitriadis comprova a possibilidade de encapsular mRNA, que codifica a proteína globina, em grandes lipossomas unilamelares de fosfatidilserina e núcleo aquoso. Esta encapsulação tornou o mRNA resistente a lavagens de ribonuclease. Já Hoffman *et. al* propuseram a hipótese de que lipossomas poderiam ser usados como veículos para a introdução de genes, apesar de ser um sistema saturável, e demonstraram que DNA com mais de 10000 pares de bases associado a vesículas de lecitina é encapsulado para o espaço interior do lipossoma, tornando-se resistente à desoxirribonuclease.²⁸⁻³⁰

Ácidos nucleicos são macromoléculas que apresentam várias características que, de modo a tornar-se alcançável o potencial terapêutico esperado, requerem uma tecnologia de sistema de entrega sofisticada. Características essas que passam por: a degradação e inativação por nucleases, a rápida eliminação plasmática, a toxicidade hemodinâmica dependente da dose, a não acumulação no alvo terapêutico em administração sistémica e, mesmo que o ácido nucleico alcance as células alvo, a impossibilidade de atravessar a membrana e atingir o espaço intracelular.^{31,32}

Para se verem ultrapassadas as dificuldades existentes na entrega de ácidos nucleicos, os sistemas de entrega a partir de NPL devem conseguir proteger o ácido nucleico, facilitar a associação por parte das células alvo e encorajar a sua libertação do endossoma para o citoplasma e, em caso do ácido nucleico ter como alvo o núcleo, a NPL ainda tem que assegurar a sua travessia pela membrana nuclear.³²

3.2. Composição das NPL

As NPL de hoje, desenvolvidas para permitir a entrega de ácidos nucleicos *in vivo*, evoluíram e apresentam algumas diferenças dos primeiros lipossomas que deram os primeiros passos na encapsulação lipídica na terapia génica, como o caso de Hoffman *et. al*. Os primeiros complexos lipídicos com ácidos nucleicos envolviam lípidos permanentemente catiónicos e agora a investigação está em torno dos lípidos catiónicos ionizáveis, os quais, a par dos

fosfolípidos, colesterol e lípidos PEGuilados fazem parte da constituição típica das NPL (Figura 2).^{20,33}

Apesar de ainda não estar perfeitamente compreendido, estima-se que, tanto o colesterol como os fosfolípidos usados na formulação das NPL estabilizam a superfície da partícula, tal como nas membranas biológicas, mas que também estão envolvidos na potência da NPL. Mais estudos serão necessários para compreender a profundidade da importância da composição da superfície das NPL e o seu impacto na estrutura da NPL e conseqüentes interações intracelulares.^{28,34}

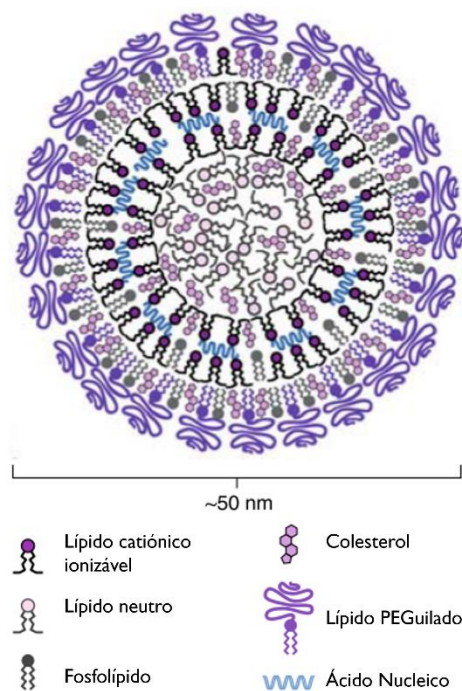


Figura 2. Representação esquemática da composição típica de uma Nanopartícula Lipídica. Contém lípidos PEGuilados, colesterol, lípidos neutros e catiónicos ionizáveis e fosfolípidos. Adaptado de ³³.

3.2.1. Lípidos permanentemente catiónicos e lípidos *helper*

Os lípidos neutros eram, com alguma regularidade, acrescentados nas formulações de lipossomas compostas por lípidos catiónicos. Um dos exemplos de lípidos neutros é o colesterol, mas um outro exemplo com menor toxicidade é o dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) (Figura 3), que é conhecido por destabilizar bicamadas lipídicas, sendo que neste caso, o objetivo é destabilização dos endossomas formados no processo de entrada celular do complexo ácido nucleico-lípido catiónico. Nas NPL mais recentes, continuam-se a usar lípidos

helper tais como distearoilfosfatidilcolina (DSPC) que são fundamentais na estabilização física e biológica da NPL demonstrado por J.A. Kulkarni *et al.*^{20,32}

Os lípidos catiónicos são constituídos basicamente por uma cabeça polar, que pode ser mono- ou policatiónica, que, através de um grupo de ligação, está conectado a um grupo hidrofóbico, constituído por um grupo alifático ou por colesterol. O primeiro relato desses complexos com lípidos catiónicos foi feito por Felgner *et al.* que formulou, juntamente com um DNA plasmídico, um lipossoma com o lípido catiónico N-[1-(2,3-dioleiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamónio (DOTMA) e com o lípido neutro DOPE (figura 3). O DOTMA é um lípido catiónico monovalente que contém dois ácidos gordos insaturados ligados a um grupo propilo por ligações de éter. Pela sua natureza catiónica proveniente do amónio quaternário, ocorre uma reação espontânea com as moléculas de ácidos nucleicos aniónicas dando-se um sistema de “auto-agrupamento” (*self-assembling system* em inglês).^{20,28,35}

A estrutura do lípido é determinante na eficiência de transfeção do ácido nucleico e da toxicidade celular, que é principalmente controlada pelo grupo catiónico da molécula. Por exemplo, lípidos catiónicos derivados do colesterol com grupo de amónio quaternário são mais tóxicos que as aminas terciárias, apesar de ambos inibirem a proteína cinase C e serem citotóxicos. Para além disso, grupos catiónicos heterocíclicos mostram ser menos citotóxicos, provavelmente pela partilha da carga positiva pelo anel. Em relação à cadeia alquilo, cadeias com 14 carbonos oferecem uma melhor transfeção que cadeias com 18 carbonos. Ainda de acrescentar, que cadeias insaturadas mostram ser mais efetivas num maior número de estudos. Por último, o grupo que liga as regiões hidrofóbicas à região hidrofílica, o grupo de ligação, costuma ser um grupo amida, éster ou éter. A ligação por éter tem maior toxicidade apesar da sua estabilidade e capacidade de transfeção. A ligação éster já tem uma menor toxicidade porém, sofre degradação por lípases, acabando por resultar numa degradação lisossomal.^{20,35}

Com isto, pode-se assegurar que existem muitos inconvenientes relacionados com os sistemas de entrega com lípidos catiónicos, principalmente de administração sistémica: devido à sua carga positiva, sofrem uma rápida *clearance* plasmática, agregam-se com os eritrócitos, acumulam-se nos pulmões, no fígado e no baço e provocam a ativação das células do sistema imune.²⁰

Um grande salto no desenvolvimento nas NPL mais farmacologicamente aceitáveis foi a descoberta dos lípidos ionizáveis.²⁸

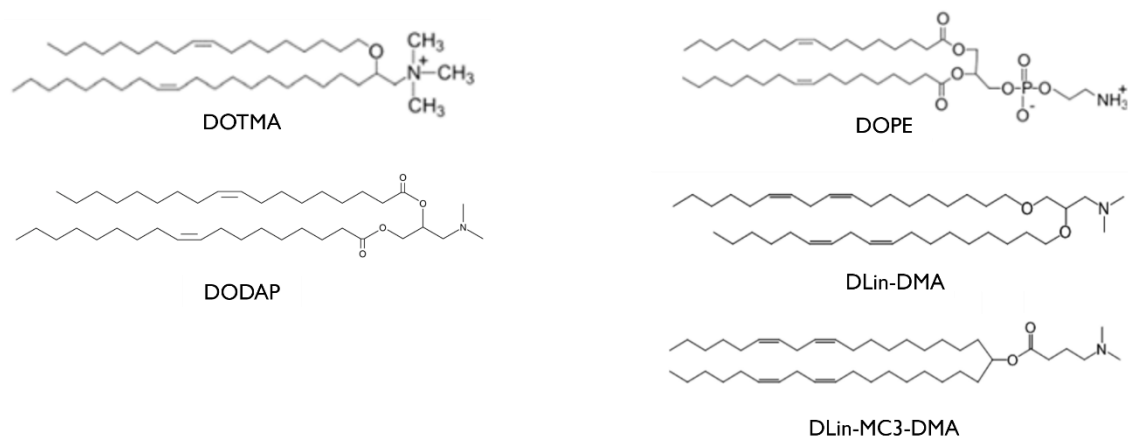


Figura 3. Estruturas químicas de lípidos usados em formulações lipídicas. DOTMA, N-[1-(2,3-dioleiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamônio. DOPE, dioleilfosfatidiletanolamina. DODAP, 1,2-dioleoil-3-dimetilamônio propano. DLinDMA, 1,2-dilinoileloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano. DLin-MC3-DMA, heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il-4-(dimetilamino)-butanoato. *Adaptado de* ²⁰.

3.2.2. Lípidos catiónicos ionizáveis

Os lípidos ionizáveis são tipicamente constituídos por um grupo amina terciária com capacidade de protonação, duas cadeias hidrofóbicas e um grupo de ligação. Estes lípidos têm o pK_a inferior a 7, o que significa que a pH ácido estão protonados, o que permite complexar com ácidos nucleicos carregados negativamente e permite a interação com a membrana do endossoma devido ao pH ácido aí presente. A pH fisiológico, a superfície do NPL apresenta-se praticamente neutra, sendo que assim há maior tolerabilidade e maior tempo de circulação no organismo. A otimização do pK_a do aminolípido é importante para que seja suficientemente baixo para que esteja pouco ionizado a pH fisiológico, mas também suficientemente alto para que a NPL esteja ionizada no pH endossomal e interaja com os lípidos aniônicos da membrana do endossoma.^{20,28,32}

O primeiro aminolípido ionizável usado numa formulação foi o 1,2-dioleoil-3-dimetilamônio propano (DODAP) (Figura 3). Este aminolípido contém duas ligações duplas e foi a partir desta molécula que se desenvolveram outras. A síntese de aminolípidos sofreu uma abordagem de descoberta da relação estrutura-atividade. A primeira geração de aminolípidos acabou por ser otimizada numa molécula com grupos de ligação éter e cadeias hidrofóbicas linoleílicas: 1,2-dilinoileloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLinDMA) cuja estrutura está representada na Figura 3. Mais tarde, Jayaraman *et al.* demonstraram que se se trocar o grupo acetal por um éster carboxílico e se mantiver um único ponto de ligação para as duas cadeias alquílicas se obtém um lípido com maior potência: o heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il-4-

(dimetilamino)-butanoato (DLin-MC3-DMA) (Figura 3). Esta molécula tem um tempo de semivida plasmática de 70 horas e um pK_a de 6,44, que se encontra no intervalo estimado por Jayaraman *et al.* como o intervalo para atividade ótima no hepatócito.^{20,28}

Apesar de DLin-MC3-DMA ter um pK_a otimizado, é de ter em conta que o pK_a da NPL como um todo é que importa realmente para a eficácia do sistema de entrega e não apenas o pK_a do lípido catiónico ionizável isoladamente.²⁰

3.2.3. Lípidos PEGuilados

Estas moléculas têm uma estrutura geral de dois domínios, sendo que um é o polímero hidrofílico de poli(etilenoglicol) (PEG) que está conjugado com uma âncora lipídica. Essa âncora é a parte que estará complexada com os restantes componentes lipídicos, e o polímero PEG mantém-se na superfície. O uso destes lípidos começou por diminuir a rápida *clearance* que as NPL sofriam, pois o PEG forma uma barreira estérea impedindo a opsonização, e mais tempo na corrente sanguínea significa maior probabilidade na acumulação das NPL nos locais alvo. No entanto, também se usam lípidos PEGuilados na determinação do tamanho de partículas na produção de NPL e na prevenção da fusão de partículas nesse mesmo processo.²⁸

Apesar da sua importância, o PEG também interfere com etapas cruciais do sistema de entrega. Uma superfície coberta de cadeias de PEG interfere na captação das NPL pelas células, tal como interfere no escape do ácido nucleico para o citoplasma, por impedimento estéreo (os lípidos da NPL não se fundem com a membrana do endossoma). Por estas razões, a quantidade de PEG na formulação de NPL é mantido no mínimo e com cadeias alquilo de 14 carbonos. Assim, o lípido PEGuilado mantém-se na superfície da NPL durante o armazenamento da formulação mas após a administração, poderá difundir deixando a NPL desprotegida e com capacidade de interagir com a célula alvo.^{20,28,36}

3.2.4. Lípidos biodegradáveis

Em situações em que é necessária uma grande frequência de administração de NPL, por exemplo sistemas de entrega de mRNA codificantes para uma proteína em falta no organismo, é necessário ponderar a possibilidade de toxicidade. A substituição do lípido catiónico ionizável por um biodegradável poderá aumentar o perfil de segurança, a biocompatibilidade e tolerância mas também aumentará a instabilidade da NPL.^{20,28,37}

Miao *et al.* demonstrou os efeitos sinérgicos na formulação de NPL com lípidos biodegradáveis e não biodegradáveis para a entrega de mRNA codificante para a eritropoietina

e a junção destes lípidos na NPL pode não só aumentar a produção da eritropoietina como a eficiência de transfeção da mesma.³⁷

3.3. Formulação das NPL

Os critérios para o *design* de NPL como sistemas de entrega de pequenas moléculas, mantêm-se para as NPL que transportam macromoléculas para terapia génica. Esses critérios são o tamanho de partícula no máximo de 100 nanómetros, processos de encapsulação muito eficientes, processo de formulação transponível para maiores escalas e estabilidade do produto por pelo menos 1 ano a 4°C.⁸

O uso de lípidos ionizáveis permite que a superfície da NPL seja relativamente neutra a pH fisiológico e evita uma grande extensão de ligação a proteínas plasmáticas, permitindo assim que um maior número de NPL atinja as células alvo. Portanto, o método de complexação entre os lípidos catiónicos e ácidos nucleicos não é útil para a aplicação *in vivo* com lípidos catiónicos ionizáveis.^{8,28}

Os lípidos são solúveis em etanol, e a técnica da diluição em etanol para a formulação de NPL tira partido dessa propriedade. É uma técnica robusta e com possibilidade de transposição para grande escala, a qual tem por base a dissolução dos lípidos a usar na NPL (aminolípidos, lípidos *helper*, colesterol e lípidos PEGuilados) nas concentrações apropriadas e encapsulação de ácidos nucleicos dissolvidos numa solução tampão a pH 4. Para misturar as soluções pode ser usado o instrumento *microfluidic micromixer* para a uma escala laboratorial de NPL. Para uma maior escala, a mistura pode ser efetuada com um misturador “*T-tube*”.^{28,32}

Cullis *et al.* demonstra que com a técnica, usando o *microfluidic micromixer*, a formulação do LNP com lípido catiónico ionizável/DSPC/colesterol/lípido PEGuilado, nas proporções de 40/11.5/47.5/1, apresenta a formação de micelas invertidas no seu interior, em algumas delas estão contidos o siRNA. O núcleo destas NPL é denso em eletrões, a técnica tem elevada eficiência de encapsulamento e as NPL apresentam aproximadamente 90 nanómetros.^{20,38}

3.4. Exemplos clínicos de NPL e ácidos nucleicos

Já foram aprovadas pela autoridades regulamentares europeia e americana várias terapêuticas com base em lipossomas que contêm principalmente fármacos como pequenas moléculas. Estes sistemas têm a vantagem de serem pequenos e por sua vez ter ação em locais como tumores com vasculatura de pequeno diâmetro.

No entanto, a investigação de NPL como sistema de entrega de macromoléculas culminou, primeiramente, em 2018 com a autorização do Onpattro® para o tratamento de

polineuropatias derivadas de Amiloidose hereditária por Transtirretina (hATTR), uma doença autossômica dominante. E agora, mais recentemente, na autorização condicional de introdução no mercado pela Agência Europeia do Medicamento de duas vacinas contra a doença infecciosa do Coronavírus (COVID-19).

3.4.1. Onpattro[®]

O Onpattro[®] é uma NPL otimizada para entrega de siRNA nos hepatócitos, pois esse é o local principal de síntese da Transtirretina. Na Amiloidose, essa proteína não ganha a sua estrutura quaternária correta e leva à acumulação de fibrilhas amiloides insolúveis nos nervos periféricos e em múltiplos órgãos. Este sistema de entrega de NPL com um siRNA ligeiramente modificado leva ao silenciamento da expressão do gene que codifica a Transtirretina. Em estudos pré-clínicos procurou-se encontrar a NPL com a habilidade de encapsular o siRNA e de o entregar até ao citoplasma de hepatócitos *in vivo*, após uma administração intravenosa. Para otimizar as propriedades de silenciamento do gene nos hepatócitos, foram realizados estudos *in vivo* através de ratinhos onde se observou o silenciamento do gene que codifica o fator VII, que é sintetizado nos hepatócitos. Foi executado o *screening* de mais de 300 lípidos ionizáveis e pode-se aferir que o lípido DLinDMA (1^a geração de lípidos catiónicos ionizáveis) tem a capacidade de silenciar genes nos hepatócitos, mas o DLin-MC3-DMA (2^a geração de lípidos catiónicos ionizáveis) é o lípido ionizável que apresentou mais tolerabilidade e potência no silenciamento do fator VII.^{36,39}

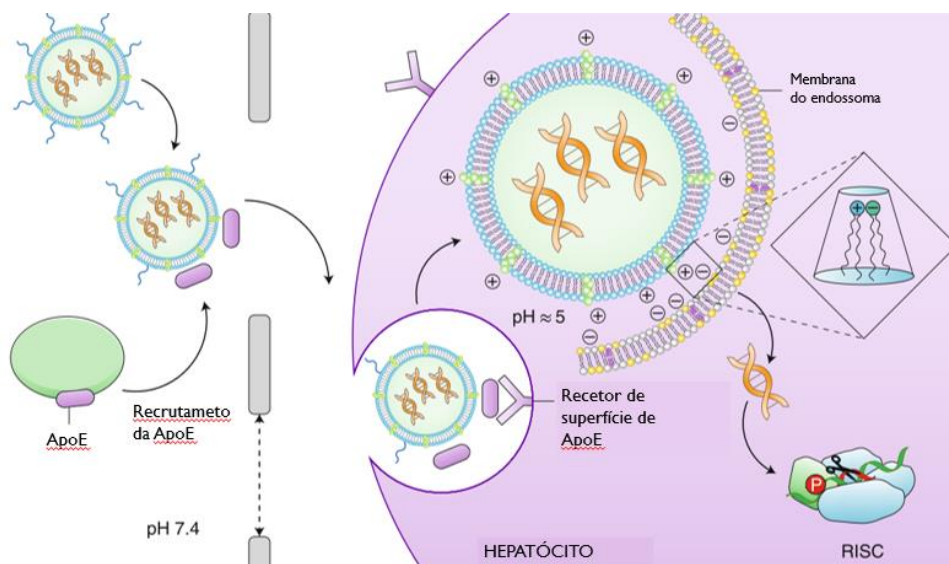


Figura 4. Modelo do sistema de entrega de siRNA *in vivo* utilizado no Onpattro[®]. A ligação da ApoE à NPL é que permite a ligação deste sistema à superfície do hepatócito, para mais tarde ser internalizado sob a forma de um endossoma. Com as mudanças de pH, existe a destabilização da membrana do endossoma e a libertação citosólica do siRNA. O siRNA atuará no RISC para silenciar o gene que codifica a Transtirretina. ApoE, apolipoproteína E. RISC, RNA-induced silencing complex. Adaptado de ³⁶

Portanto, o Onpattro[®] é um sistema de entrega sistémica de siRNA de NPL constituído por DLin-MC3-DMA, DSPC, colesterol e lípidos PEGuilados modificados. Uma vez na circulação sistémica, os lípidos PEGuilados separam-se da NPL e a apolipoproteína E (Apo E) interage com o colesterol presente no complexo lipídico. Dessa forma, as NPL marcadas com Apo E são direcionadas para os hepatócitos onde a Apo E se liga ao recetor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) aí presente e a NPL sofre endocitose. Dentro do endossoma, com a diminuição do pH, o lípido ionizável torna-se catiónico, o que provoca uma rutura da membrana e a respetiva libertação do ácido nucleico para o citosol do hepatócito (Figura 4).^{39,40}

O mecanismo de ação do siRNA passa pela sua ligação a uma porção do mRNA codificante para a Transtirretina (mutante ou não). Esta ligação desencadeia a ativação da proteína Argonauta, pertencente ao RISC, que degrada o mRNA e impede a sua tradução (Figura 4).³⁹

Nos ensaios clínicos de 18 meses APOLLO de fase III, foi inferido que o Onpattro tem mais benefícios terapêuticos que o tratamento usado até àquele momento.³⁹

3.4.2. Vacinas contra o SARS-CoV-2

Em março de 2020, foi decretado pela Organização Mundial de Saúde uma declaração de pandemia global de COVID-19, cujo vírus causador é o SARS-CoV-2. Os sintomas de uma pessoa infetada por este vírus são idênticos a uma gripe ou constipação (febre, tosse, fadiga, entre outros) e a sua transmissão é provavelmente efetuada através do contacto direto com a pessoa infetada e da sua propagação de gotículas.^{25,41}

Este vírus contém um envelope, RNA de cadeia simples e 4 proteínas estruturais: proteína do envelope, proteína da membrana, proteína da nucleocápside e a glicoproteína de superfície *spike* (S). A S tem dois subdomínios: S1, responsável pela ligação aos recetores da enzima conversora da angiotensina 2, e a S2, que contém a maquinaria necessária para a fusão que permite a entrada do vírus na célula do hospedeiro. O subdomínio S2 é uma porção de proteína conservada entre os coronavírus, enquanto o S1 tem diferenças. Dentro de vários epítomos existentes no SARS-CoV-2, a proteína S é a selecionada para o desenvolvimento das vacinas por ser a responsável por mediar a entrada na célula hospedeira.⁴¹

Quando se compara vacinas de vírus atenuados ou de DNA com vacinas de mRNA, as de mRNA tem a vantagem de não serem infecciosas e de apenas atingirem o citoplasma das células. No entanto, no *design* da vacina de mRNA é necessário ter em conta a redução da

reatogenicidade, uma adequada escolha do antígeno e uma otimização da sua expressão e formulação de uma vacina com um sistema de entrega eficiente.^{33,42}

Em relação ao mRNA, esta é uma molécula lábil de rápida degradação e, com vista à melhoria da sua tradução, segurança e tempo de semivida, foram testadas algumas modificações na molécula. A modificação que evita uma inflamação excessiva e que não desencadeia mecanismos do sistema imune inato (deteção de padrões moleculares associados a patogénicos) é a incorporação de NI-metil-pseudouridina em vez de uridina, que foi a modificação adotada nas duas vacinas de mRNA-NPL com autorização condicional de introdução no mercado pela Agência Europeia do Medicamento: Comirnaty® (BioNTech/Pfizer) e Spikevax® (Moderna/NIAID/BARDA). A primeira já apresenta autorização de comercialização pela Agência Federal dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration*), enquanto a vacina da Moderna ainda mantém a autorização de uso de emergência por esta Agência.^{42,43}

O sistema de entrega usado na vacina Comirnaty® é uma NPL com um lípido catiónico ionizável patenteado, *Acutas* ALC-0315 (Figura 5), combinado com DSPC, colesterol e lípido PEGuilado.^{44,45}

O sistema de entrega usado na vacina Spikevax® contém o lípido SM-102 (Figura 5), uma nova classe de lípidos ionizáveis com atividade otimizada para administração por via intramuscular em comparação com o lípido DLin-MC3-DMA do Onpattro®.⁴⁴

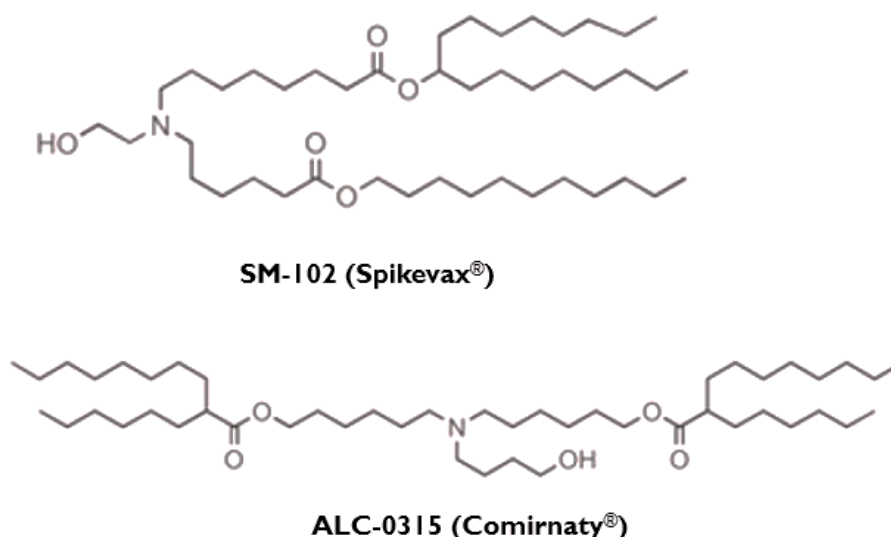


Figura 5. Estruturas químicas dos lípidos usados nas vacinas de mRNA Spikevax® e Comirnaty®. Adaptado de ⁴³.

Após a imunização, há produção de antígenos e captação destes por células apresentadoras de antígenos que estabelecem interação com linfócitos B e linfócitos T *helper*. Os linfócitos T *helper* irão induzir os linfócitos B na produção de anticorpos neutralizantes para o antígeno da vacina. Dados acerca da vacina Comirnaty® mostram que após 10 dias da primeira inoculação já é detetável uma quantidade significativa de linfócitos T que aumenta ainda mais após a segunda dose da vacina, enquanto anticorpos neutralizantes aparecem em maiores quantidades apenas após 3 semanas da primeira dose. Portanto a vacina produz imunidade humoral e adaptativa e a durabilidade dessa imunidade só se concluirá com estudos de longa duração.^{43,46}

As vantagens de uma vacina baseada em mRNA assentam na rapidez com que se elaborou a vacina (em apenas 66 dias, após a publicação do genoma do vírus, a Moderna iniciou os ensaios clínicos) por apenas necessitar basicamente do DNA modelo. Também assentam na resposta imune potente desencadeada pela vacina: as vacinas de mRNA-NPL têm uma eficácia maior que 94%, enquanto uma vacina com vetor adenovírus (AstraZeneca/University of Oxford) é eficaz em 70%. Outro aspeto positivo nestas vacinas é a facilidade em modificar o mRNA contido na NPL consoante a necessidade: estas vacinas conseguem facilmente ser ajustadas para novas variantes de SARS-CoV-2 que emergem.⁴⁴

No entanto, esta abordagem também apresenta uma lista de desafios, dado que é a primeira vez que vacinas deste tipo são autorizadas, situação que apresenta algumas incógnitas associadas como por exemplo, casos de anafilaxia aos componentes da vacina ou a incerteza da duração de imunidade conferida. Uma outra desvantagem destas vacinas é a termoestabilidade, já que, para manter o mRNA íntegro, é necessário mantê-lo em condições de refrigeração agressivas. A vacina da BioNTech/Pfizer necessita de temperaturas que rondam os - 60°C e a vacina da Moderna/NIAID/BARDA necessita de temperaturas entre os 4 - 8°C para um armazenamento de um mês. Estas temperaturas tornam mais difícil a distribuição mundial e o armazenamento para os países ditos subdesenvolvidos que não consigam garantir estas condições.^{42,43,47}

3.5. NPL e entrega extrahepática

Para alterar o tropismo hepático das NPL, um grupo de investigação do departamento de bioquímica do *Simmons Comprehensive Cancer Center* nos Estados Unidos da América, adicionou ao modelo clássico da NPL de quatro componentes (lípidio catiónico ionizável, fosfolípido, colesterol e lípidio PEGuilado), um outro componente que altera a carga interna da NPL, com a hipótese de que diferentes cargas internas levariam a diferentes tropismos *in*

vivo. A este quinto componente chamaram de *Selective ORgan Targeting* (SORT). Testaram como SORT um lípido permanentemente catiónico que demonstrou otimizar o tropismo pulmonar da NPL e um lípido aniônico como SORT que permitiu entrega até ao baço. O grupo demonstrou que terapêuticas com NPL que têm como alvo o fígado podem ser redirecionadas para os pulmões ou o baço, consoante o SORT utilizado.⁴⁸

4. NPL COMO SISTEMA DE ENTREGA DE CRISPR/CAS9

Tendo em conta que NPL que encapsulam ácidos nucleicos e que processam a sua entrega com sucesso já é um assunto presente na clínica (exemplos descritos nos pontos 3.4.1. e 3.4.2. desta monografia), a utilização deste sistema de entrega para tecnologias de edição de genes também está a evoluir.

4.1. Terapia génica

A edição genética não só permite a adição e o silenciamento de genes, mas também a correção e outras modificações altamente direcionadas. Portanto conseguem corrigir-se mutações quando se conhece a etiologia da doença genética (ou seja, o alvo terapêutico é necessariamente bem definido) e por sua vez a edição genética tem elevado potencial em provocar efeitos clínicos no doente e baixo potencial de toxicidade e imunogenicidade pela vantagem da modificação ser permanente, isto é, idealmente, para efetuar terapia génica, por exemplo através de enzimas de edição genética, o tratamento acontece apenas uma vez.^{1,49}

Para editar o genoma, é necessário gerar quebra da cadeia dupla de DNA (em inglês *Double-Stranded DNA Breaks*, DSB) num local específico, e após o DSB, os eucariotas compreendem dois mecanismos de reparação: junção final não homóloga (em inglês *Non-Homologous End Joining*, NHEJ) e reparação dirigida homologamente (em inglês *Homology-Directed Repair*, HDR). O primeiro processo, propenso à formação de erros, exige ligação direta, deleção ou inserção de nucleótidos, sendo que é o mecanismo preferível para a deleção ou inativação de genes. A reparação por HDR tem uma incidência menor que a reparação por NHEJ pois trata-se de uma reparação que utiliza um *template* do cromatídeo irmão, portanto, para a correção ou adição de genes, é necessário usufruir deste método de reparação e adicionar uma sequência de DNA exógena (com o gene de interesse ou com a correção requerida) contendo nas extremidades sequências homólogas. Para provocar DSB num local específico foram desenvolvidas nucleases programáveis de edição de genes.⁵⁰

4.2. Enzimas de edição de genes

Uma das enzimas de edição de genes habitualmente usadas é a Cre recombinase. É uma recombinase de tirosina local-específico (em inglês *tyrosine site-specific recombinase*), enzima usada para a manipulação genética que cliva, troca de cadeia de DNA e que reconecta o DNA com as respetivas sequências palindrómicas. Esta enzima é regularmente usada como modelo para investigar sistemas de entrega para proteínas mas não pode ser aplicada em células de mamíferos pois o local de reconhecimento específico não existe nestas células. Porém, homólogos desta enzima poderão ser modificados por forma a conseguir-se aplicar a recombinação genética em mamíferos. A desvantagem primordial é a necessidade de técnicas sofisticadas para mudar o local de reconhecimento específico da recombinase.^{49,51}

É de referir também outros dois sistemas compostos por dois domínios: domínio de ligação ao DNA e domínio de clivagem do mesmo. O primeiro sistema é a *Nuclease de Dedo de Zinco* (em inglês *Zinc-Finger Nuclease*, ZFN), enzima de edição genética que contém uma endonuclease *FokI*, que, para concretizar uma clivagem, necessita de duas moléculas, isto é, na presença de uma dimerização do sistema ZFN é possível efetuar-se o corte da sequência de DNA específica para o domínio *Zinc-Finger* (que pode ser personalizado de modo a reconhecer e a conectar-se a uma sequência específica). O mesmo acontece com o sistema *Nuclease Efetora Semelhante a Ativador de Transcrição* (em inglês *Transcription Activator-Like Effector Nuclease*, TALEN), cujo funcionamento é idêntico ao ZFN, (fusão de dois domínios, um deles a enzima de restrição *FokI*) sendo que a maior diferença é o TALEN ser mais específico e proporcionar menor número de clivagens fora do alvo, ser menos citotóxico que o ZFN, mais fácil de produzir e por sua vez proporcionar edições de genes mais rápidas e menos dispendiosas, mas como a molécula TALEN é maior, torna a sua entrega mais difícil de concretizar.^{6,49,50,52,53}

Todos estes sistemas de edição genética têm a desvantagem de envolver técnicas complicadas de engenharia proteica e isso torna-se um limite na aplicação em terapia génica, no entanto, foi descoberto um sistema imune adaptativo de várias bactérias que abriu portas para ultrapassar estas dificuldades.^{49,52}

4.3. CRISPR-Cas9

Repetições palindrómicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas (em inglês *Clustered Regularly InterSpaced Palindromic Repeats*, CRISPR) são segmentos de DNA que foram detetados em várias bactérias. Estes segmentos são derivados de plasmídeos e vírus patogénicos que invadiram a bactéria anteriormente. O CRISPR pertence ao sistema imune

adaptativo de algumas bactérias e serve para detetar e depois eliminar ácidos nucleicos de invasores. Juntamente com a endonuclease associada ao CRISPR (Cas) é formado o sistema CRISPR-Cas: nuclease de DNA que usa uma sequência de RNA como guia (em inglês *single guide RNA*, sgRNA) que é complementar à sequência de DNA para a qual há interesse clivar.^{49,52}

A Cas9 é a proteína Cas mais utilizada pela sua eficácia e simplicidade pois é facilmente direcionada pela complementaridade ao sgRNA e pelo reconhecimento de um *protospacer-adjacent motif* (PAM) (conjunto de três nucleótidos frequentes em sequências de DNA aleatórias). Esta nuclease é composta por dois domínios: RuvC e HNH. Na presença de PAM e de complementaridade entre o DNA alvo e o sgRNA, o domínio HNH cliva a cadeia de DNA na qual se formou o heteroduplex sgRNA:DNA e o domínio RuvC cliva a cadeia de DNA complementar formando DSB. Nesse local, onde existe DSB, posteriormente irá ocorrer reparação por um dos dois mecanismos já conhecidos: NHEJ ou HDR (caso seja doado um *template* de DNA).^{50,52,54,55}

Este sistema de edição de genes, protagonista do Prémio Nobel da Química de 2020, é bastante promissor principalmente em relação a outros sistemas de enzimas de edição genética também existentes atualmente, pois o CRISPR/Cas9 não tem necessidade de adaptar a nuclease consoante a sequência alvo, mas sim modificar a sgRNA que torna o sistema mais facilmente ajustável por exemplo, a diferentes doenças genéticas. No entanto, devido a ligações a DNA fora do alvo provocadas pela sgRNA, a Cas pode ser modificada para melhorar a especificidade do sistema.^{50,54,56}

Relativamente à forma como o sistema CRISPR/Cas9 pode ser transportado até o local alvo, existem três estratégias: sob a forma de um plasmídeo codificante para a Cas9 e para o sgRNA, entrega da mistura contendo a sequência mRNA correspondente à Cas9 e a sequência sgRNA ou através da entrega mistura da nuclease na sua forma proteica e a respetiva sequência sgRNA. A primeira estratégia produz mais efeitos fora do alvo que a segunda estratégia de mRNA, mas a terceira estratégia é a mais estudada e utilizada por ser a que apresenta menos efeitos fora do alvo, toxicidade e imunogenicidade, mantendo uma elevada eficiência na edição de genes. A nuclease Cas9 tem carga positiva e facilmente complexa com sgRNA formando complexos de ribonucleoproteína (RNP), porém a proteção contra a degradação ou desnaturação de RNP durante o processo de formulação e entrega é desafiante.^{54,57}

4.3.1. Métodos de entrega do sistema CRISPR/Cas9-NPL

A Cas9, por ser uma enzima derivada de uma proteína de origem bacteriana, quando inserida no hospedeiro, causa respostas imunes. Para evitar o desencadeamento da resposta do sistema imune, é necessário proteger a molécula através do sistema de entrega.⁴⁹

O sistema de entrega para o CRISPR/Cas9 idealmente apresentará características que permitirão que o CRISPR/Cas9 tenha uma expressão transitória por forma a limitar a sua ação fora do alvo, respostas imunes e a integração no genoma humano. Para além disso, o sistema de entrega terá que ter uma elevada capacidade de carga para albergar a grande molécula Cas9 ou o seu mRNA correspondente e possibilitar a administração de outra dose, caso o efeito da terapêutica diminua ou não atinja o nível de edição genética necessária com apenas uma dose. Outro atributo a ter em conta deverá também ser a viabilidade para transpor a produção para larga escala, como referido anteriormente.⁵⁸

Vários métodos foram desenvolvidos no sentido de concretizar a entrega do sistema CRISPR/Cas9 com elevada eficiência, tais como vetores virais, métodos físicos (microinjeção e eletroporação) e vetores não-virais.⁵⁰

Um dos exemplos de vetores não-virais são as NPL. Este sistema de entrega por já ser usado na clínica na entrega de ácidos nucleicos tem o potencial de ter a capacidade de efetuar a entrega de CRISPR/Cas9. Como este sistema de entrega já apresenta um historial de sucesso na entrega de siRNA, várias hipóteses foram geradas acerca da utilização do sistema de entrega de NPL para estabelecer a entrega do sistema CRISPR/Cas9.^{58,59}

4.3.2. Exemplos de ensaios clínicos de CRISPR/Cas9 e NPL

Finn *et al.* desenvolveu uma NPL-“LNP-INT01”- com a capacidade de entregar mRNA e sgRNA correspondente ao gene que codifica a proteína Transtirretina, em ratinhos e ratos, para o tratamento de hATTR (tratamento para a mesma doença que o Onpattro®). A NPL contém lípido ionizável biodegradável com o nome de “LP01” (evita bioacumulação no fígado) juntamente com lípido *helper* e lípido PEGuilado. Após a entrega da proteína verde fluorescente através do LNP-INT01 com sucesso, foi desenhada uma sequência sgRNA para o gene da Transtirretina no ratinho com modificações químicas que permitiram uma robusta e durável atividade *in vivo*.⁵⁸

O gene *PCSK9* (codifica para a proteína proproteína convertase subtilisina/cexina tipo 9) é um bom candidato a alvo de edição genética com recurso a NPL porque as alterações provocadas nesse gene que provoquem ganho de função causam hipercolesterolemia familiar

e os casos de perda de função natural desse gene mostram diminuir os níveis séricos de LDL e também um menor risco de doenças cardiovasculares. Apesar de existirem exemplos de edição genética *in vivo* em roedores com recurso a CRISPR/Cas9, Musunuru *et al.* utilizou um editor de bases adenina com CRISPR (CRISPR/Cas9 e fusão com enzima que induz alterações no ácido nucleico sem recurso a DSB) para fazer a alteração de um nucleótido e provocar perda de função do gene *PCSK9* em *Macaca fascicularis* (primata). Musunuru *et al.* reportou uma eficiente inativação do gene no fígado de *Macaca fascicularis* e uma redução de LDL sérica em cerca de 60% que iguala ou ultrapassa os efeitos de medicamentos usados atualmente. No entanto mais estudos acerca do risco na edição de bases são necessários antes de avançar com ensaios clínicos em humanos.^{60,61}

O ensaio clínico de fase I acerca do candidato NTLA-2001 é o primeiro a gerar dados de segurança e eficácia acerca de edição de genes com recurso à tecnologia de CRISPR/Cas9 e administrado por via sistémica. O NTLA-2001 é uma NPL de propriedade da *Intellia Therapeutics* com tropismo hepático com o intuito de inibir a produção da Transtirretina nos indivíduos que apresentem hATTR. A NPL contém mRNA que codifica a endonuclease Cas9 e contém a sgRNA correspondente. Estas partículas inativam a produção da Transtirretina nos hepatócitos através da atividade de CRISPR-Cas9 e por reparação do DNA por NHEJ. Os primeiros dados a ser revelados foram que em 28 dias não foram observados efeitos adversos e que nesse período observou-se até 96% de redução dos níveis séricos da Transtirretina, mostrando ser uma estratégia com potencial, principalmente se os baixos valores séricos se mantiverem.^{62,63}

5. CONCLUSÃO

As NPL são um sistema de entrega que será provavelmente alvo de investigação e aprimoramento durante muitos anos. Com os sucessos clínicos alcançados, com elevado impacto em toda a população mundial, como o caso das vacinas para a COVID-19, e com as perspectivas em relação a novas terapêuticas envolvidas com terapia génica e com o sistema CRISPR/Cas9, não só confirma que a inovação em novos métodos de tratamento está ao virar da esquina, mas também ergue algumas inseguranças e incertezas em relação à realidade da terapia que envolve ácidos nucleicos e o nosso material genético. Apesar da terapia génica ser apenas possível, pela legislação atual, em células somáticas, a preocupação dos potenciais efeitos nas células germinativas não desaparece e o argumento de que não se sabe verdadeiramente o risco de haver alterações genéticas não controladas mantém-se em cima da mesa.

A ciência tem de, portanto, não só demonstrar mais e melhores tratamentos, vacinas ou métodos de diagnóstico com recurso a estas ferramentas, como terá também que garantir à sociedade que a sua utilização é segura e ética para viabilizá-las como o futuro da medicina. Esse será o verdadeiro desafio.

REFERÊNCIAS

1. DUNBAR, C. E. *et al.* - **Gene therapy comes of age.** *Science*. 359, 1–10 (2018).
2. FELGNER, P. L. - **Nonviral Strategies for Gene Therapy.** *Scientific American* 276, 102–106 (1997).
3. CAVAZZANA-CALVO, M., THRASHER, A., MAVILIO, F. - **The future of gene therapy.** *Nature*. 427, 779–781 (2004).
4. WIRTH, T., PARKER, N., YLÄ-HERTTUALA, S. - **History of gene therapy.** *Gene*. 525, 162–169 (2013).
5. TAN, X., JIA, F., WANG, P., ZHANG, K. - **Nucleic acid-based drug delivery strategies.** *Journal of Controlled Release*. 323, 240–252 (2020).
6. YIN, H. *et al.* - **Non-viral vectors for gene-based therapy.** *Nature Reviews Genetics*. 15, 541–555 (2014).
7. LIN, G. *et al.* - **Non-viral gene therapy using multifunctional nanoparticles: Status, challenges, and opportunities.** *Coordination Chemistry Reviews*. 374, 133–152 (2018).
8. CULLIS, P. R., HOPE, M. J. - **Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies.** *Molecular Therapy*. 25, 1467–1475 (2017).
9. DHIMAN, N., AWASTHI, R., SHARMA, B., KHARKWAL, H., KULKARNI, G. T. - **Lipid Nanoparticles as Carriers for Bioactive Delivery.** *Frontiers in Chemistry*. 9, 1–19 (2021).
10. FAN, Y., MARIOLI, M. & ZHANG, K. - **Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 192, 1–21 (2021).
11. TORRES-VANEGAS, J. D., CRUZ, J. C., REYES, L. H. - **Delivery Systems for Nucleic Acids and Proteins: Barriers, Cell Capture Pathways and Nanocarriers.** *Pharmaceutics*. 13, 1–38 (2021).
12. CULLIS, P. R., MAYER, L. D., BALLY, M. B., MADDEN, T. D. , HOPE, M. J. - **Generating and loading of liposomal systems for drug-delivery applications.** *Advanced Drug Delivery Reviews*. 3, 267–282 (1989).
13. XU, H., LI, Z., SI, J. - **Nanocarriers in gene therapy: A review.** *Journal of Biomedical*

- Nanotechnology. 10, 3483–3507 (2014).
14. ADLER-MOORE, J. - **AmBisome targeting to fungal infections.** Bone Marrow Transplant. 14 Suppl 5, S3-7 (1994).
 15. WALKER, L. *et al.* - **The Viscoelastic Properties of the Fungal Cell Wall Allow Traffic of AmBisome as Intact Liposome Vesicles.** mBio. 9, 1–15 (2018).
 16. BARENHOLZ, Y. - Doxil[®] - **The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned.** Journal of Controlled Release. 160, 117–134 (2012).
 17. BOVIER, P. A. - **Epaxal[®]: A virosomal vaccine to prevent hepatitis A infection.** Expert Review of Vaccines. 7, 1141–1150 (2008).
 18. Egli, M., Flavell, A., Pyle, A. M., Wilson, W. D., Haq, S I., Luisi, B., Fisher, J., Laughton, C., Allen, S., Engels, J., - **Nucleic Acids in Chemistry and Biology.** 3^a Edição, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2006. ISBN: 978-0-85404-654-6.
 19. SRIDHARAN, K., GOGTAY, N. J. - **Therapeutic nucleic acids: current clinical status.** British Journal of Clinical Pharmacology. 82, 659 (2016).
 20. RIETWYK, S., PEER, D. - **Next-Generation Lipids in RNA Interference Therapeutics.** ACS Nano. 11, 7572–7586 (2017).
 21. PERRY, C. M., BALFOUR, J. A. B. - **Fomivirsen.** Drugs. 57, 375–380 (1999).
 22. BAJAN, S., HUTVAGNER, G. - **RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs.** Cells. 9, 1–27 (2020).
 23. NATURE EDUCATION - **Microarray | Learn Science at Scitable.** Disponível em: <https://www.nature.com/scitable/definition/microarray-202/>. (Acedido em 26 de julho de 2021)
 24. MASTROBATTISTA, E., HENNINK, W. E., SCHIFFELERS, R. M. - **Delivery of Nucleic Acids.** Pharmaceutical Research. 24, 1561–1563 (2007).
 25. B, U. *et al.* - **Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection.** ACS nano. 14, 3822–3835 (2020).
 26. THERMO FISHER SCIENTIFIC - **Real-Time PCR Assays.** Disponível em: <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays.html> (Acedido em 26 de julho de 2021).

27. WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Modes of transmission of virus causing COVID-19: implications for IPC precaution recommendations**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/modes-of-transmission-of-virus-causing-covid-19-implications-for-ipc-precaution-recommendations> (Acedido em: 28 de abril de 2021).
28. SAMARIDOU, E., HEYES, J., LUTWYCHE, P. - **Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives**. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 154–155, 37–63 (2020).
29. HOFFMAN, R. M., MARGOLIS, L. B., BERGELSON, L. D. - **Binding and entrapment of high molecular weight DNA by lecithin liposomes**. *FEBS Letters*. 93, 365–368 (1978).
30. DIMITRIADIS, G. J. - **Entrapment of ribonucleic acids in liposomes**. *FEBS Letters*. 86, 289–293 (1978).
31. SEMPLE, S. C. *et al.* - **Efficient encapsulation of antisense oligonucleotides in lipid vesicles using ionizable aminolipids: formation of novel small multilamellar vesicle structures**. *Biochimica et biophysica acta*. 1510, 152–66 (2001).
32. KULKARNI, J. A. *et al.* - **Design of lipid nanoparticles for in vitro and in vivo delivery of plasmid DNA**. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 13, 1377–1387 (2017).
33. KULKARNI, J. A. *et al.* - **The current landscape of nucleic acid therapeutics**. *Nature Nanotechnology*. 16, 630–643 (2021).
34. PATEL, S. *et al.* - **Naturally-occurring cholesterol analogues in lipid nanoparticles induce polymorphic shape and enhance intracellular delivery of mRNA**. *Nature Communications*. 11, 1–13 (2020).
35. ZHANG, S. *et al.* - **Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery**. *Journal of Controlled Release*. 100, 165–180 (2004).
36. AKINC, A. *et al.* - **The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs**. *Nature Nanotechnology*. 14, 1084–1087 (2019).
37. MIAO, L. *et al.* - **Synergistic lipid compositions for albumin receptor mediated**

- delivery of mRNA to the liver.** Nature Communications. 11, 1-13 (2020).
38. LEUNG, A. K. K., TAM, Y. Y. C., CHEN, S., HAFEZ, I. M., CULLIS, P. R. - **Microfluidic Mixing: A General Method for Encapsulating Macromolecules in Lipid Nanoparticle Systems.** Journal of Physical Chemistry B. 119, 8698–8706 (2015).
 39. URITS, I. *et al.* - **A Review of Patisiran (ONPATTRO®) for the Treatment of Polyneuropathy in People with Hereditary Transthyretin Amyloidosis.** Neurology and Therapy. 9, 301–315 (2020).
 40. SEBASTIANI, F. *et al.* - **Apolipoprotein e Binding Drives Structural and Compositional Rearrangement of mRNA-Containing Lipid Nanoparticles.** ACS Nano. 15, 6709–6722 (2021).
 41. SHIN, M. D. *et al.* - **COVID-19 vaccine development and a potential nanomaterial path forward.** Nature Nanotechnology. 15, 646–655 (2020).
 42. BETTINI, E., LOCCI, M. - **SARS-CoV-2 mRNA Vaccines: Immunological Mechanism and Beyond.** Vaccines. 9, 147 (2021).
 43. CHAUDHARY, N., WEISSMAN, D., WHITEHEAD, K. A. - **mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation.** Nature Reviews Drug Discovery. 20, 817–838 (2021).
 44. BUSCHMANN, M. D. *et al.* - **Nanomaterial Delivery Systems for mRNA Vaccines.** Vaccines. 9, 1-30 (2021).
 45. ACUITAS THERAPEUTICS INC. **Novel lipids and lipid nanoparticle formulations for delivery of nucleic acids** ANSELL, S. M., DU, X. Patente WO/2015/199952 30 dez..2015. Disponível em: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2015199952&tab=PCTBIBLIO> (Acedido em 29 de julho de 2021).
 46. BERTOLETTI, A., LE BERT, N., QUI, M., TAN, A. T. - **SARS-CoV-2-specific T cells in infection and vaccination.** Cellular & Molecular Immunology. 18, 2307–2312 (2021).
 47. KHURANA, A. *et al.* - **Role of nanotechnology behind the success of mRNA vaccines for COVID-19.** Nano Today. 38, 1-6 (2021).
 48. CHENG, Q. *et al.* - **Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing.** Nature nanotechnology.

- 15, 313–320 (2020).
49. LI, J., RØISE, J. J., HE, M., DAS, R. & MURTHY, N. - **Non-viral strategies for delivering genome editing enzymes.** *Advanced Drug Delivery Reviews.* 168, 99–117 (2021).
 50. LINO, C. A., HARPER, J. C., CARNEY, J. P. & TIMLIN, J. A. - **Delivering crispr: A review of the challenges and approaches.** *Drug Delivery.* 25, 1234–1257 (2018).
 51. MEINKE, G., BOHM, A., HAUBER, J., PISABARRO, M. T., BUCHHOLZ, F. - **Cre Recombinase and Other Tyrosine Recombinases.** *Chemical Reviews.* 116, 12785–12820 (2016).
 52. DOUDNA, J. A., CHARPENTIER, E. - **The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9.** *Science.* 346, (2014).
 53. BIBIKOVA, M., GOLIC, M., GOLIC, K. G., CARROLL, D. - **Targeted Chromosomal Cleavage and Mutagenesis in Drosophila Using Zinc-Finger Nucleases.** *Genetics.* 161, 1169–1175 (2002).
 54. LIU, C., ZHANG, L., LIU, H., CHENG, K. - **Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications.** *Journal of Controlled Release.* 266, 17–26 (2017).
 55. BARRANGOU, R. - **Cas9 targeting and the CRISPR revolution.** *Science.* 344, 707–708 (2014).
 56. NOBEL FOUNDATION. **Press release: The Nobel Prize in Chemistry 2020.** Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/press-release/> (Acedido em 11 de outubro de 2021).
 57. WEI, T., CHENG, Q., MIN, Y.-L., OLSON, E. N., SIEGWART, D. J. - **Systemic nanoparticle delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins for effective tissue specific genome editing.** *Nature Communications.* 11, 3232 (2020).
 58. FINN, J. D. *et al.* - **A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing.** *Cell reports.* 22, 2227–2235 (2018).
 59. ROSENBLUM, D. *et al.* - **CRISPR-Cas9 genome editing using targeted lipid nanoparticles for cancer therapy.** *Science Advances.* 6, 1-12 (2020).

60. LAPINAITE, A. *et al.* - **DNA capture by a CRISPR-Cas9-guided adenine base editor.** *Science.* 369, 566–571 (2020).
61. MUSUNURU, K. *et al.* - **In vivo CRISPR base editing of PCSK9 durably lowers cholesterol in primates.** *Nature.* 593, 429-434 (2021).
62. DEMING, M. E. & LYKE, K. E. - **A first step toward in vivo gene editing in patients.** *Nature medicine.* 27, 1510–1511 (2021).
63. GILLMORE, J. D. *et al.* - **CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis.** *New England Journal of Medicine.* 385, 493–502 (2021).