



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Francisco Emanuel Rodrigues Costa Freire

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Terapêuticas com RNA: Estratégias de Entrega Intracelular” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Nadège Couceiro, da Dra. Olga Simões e do Professor Doutor Luís Miguel Santos Loura, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Francisco Emanuel Rodrigues Costa Freire

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Terapêuticas com RNA: Estratégias de Entrega Intracelular” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Nadège Couceiro, da Dra. Olga Simões e do Professor Doutor Luís Miguel Santos Loura, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

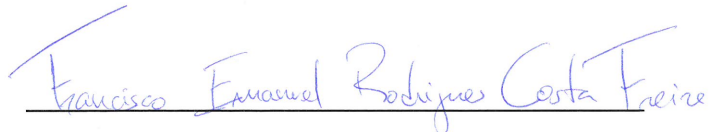
Outubro de 2021

Declaração de Honra

Eu, Francisco Emanuel Rodrigues Costa Freire, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2015237277, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Terapêuticas com RNA: Estratégias de Entrega Intracelular” 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, 18 de outubro de 2021.



(Francisco Emanuel Rodrigues Costa Freire)

Agradecimentos

Aos meus pais, irmãos e toda a família, por todos os esforços que fazem e fizeram para que eu consiga atingir todos os meus objetivos, por serem um pilar importante no meu crescimento como pessoa e por me deixarem sonhar.

À minha namorada e a toda a sua família, pelo apoio incondicional e absolutamente fundamental durante este meu percurso.

Às amigas, por todas as confidências, todos os abraços.

À Phartuna – Tuna de Farmácia de Coimbra, por todas as experiências proporcionadas, por todos os ensinamentos e por serem a minha segunda casa.

Ao excelentíssimo Professor Doutor Luís Loura, pela extraordinária ajuda e apoio na elaboração desta monografia.

À Dra. Olga Simões, por toda a preocupação e carinho.

À Dra. Nadège Couceiro, por todos os conhecimentos transmitidos.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pela capacidade de tão bem formar, e por nos fazer sempre sentir em casa.

A Coimbra, por ser luz de um amor eterno.

A todos, o meu maior F-R-A.

Índice

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas.....	8
1. Introdução.....	9
2. Análise SWOT	10
2.1. Pontos Fortes	10
2.1.1. Organização e Dinâmica Interna.....	10
2.1.2. Localização da Farmácia.....	11
2.1.3. Novo Módulo de Atendimento do SIFARMA®	11
2.1.4. Variedade de Tarefas Executadas	12
2.2. Pontos Fracos	16
2.2.1. Associação entre DCI e Nome Comercial	16
2.2.2. Aconselhamento de Produtos de Dermofarmácia e Cosmética.....	16
2.3. Oportunidades.....	16
2.3.1. Formação Contínua	16
2.3.2. Campanhas Promocionais Cartão Saúde e Rede Claro.....	17
2.4. Ameaças	17
2.4.1. Produtos esgotados e faltas em stock	17
2.4.2. Iliteracia em saúde.....	18
3. Conclusão.....	19
4. Casos Clínicos	20
Referências Bibliográficas	22
Anexos	23

Relatório de Estágio em Distribuição por Grosso de Medicamentos

Lista de Abreviaturas	25
1. Introdução.....	26
2. Plural – Cooperativa Farmacêutica, C.R.L.....	27
3. Análise SWOT	27
3.1. Pontos Fortes	27
3.1.1. Forte Automatização e Organização	27
3.1.2. Dimensão da Empresa.....	28
3.1.3. Boas Práticas de Distribuição e Política de Qualidade	29
3.2. Pontos Fracos.....	30
3.2.1. Visão sobre o Medicamento	30
3.2.2. Fraca Aplicação de Conhecimentos Científicos	30
3.3. Oportunidades.....	31
3.3.1. Perceção da Dinâmica Entre Farmácias e Laboratórios	31
3.3.2. Familiarização com Produtos Farmacêuticos.....	31
3.4. Ameaças	32
3.4.1. Papel do Farmacêutico na Distribuição Grossista	32
3.4.2. Margens de Comercialização	32
4. Conclusão.....	34

Referências Bibliográficas	35
Monografia - “Terapêuticas com RNA: Estratégias de Entrega Intracelular”	
Resumo	37
Abstract	38
Lista de Abreviaturas	39
1. Introdução.....	41
2. Tipos de RNA	42
2.1. mRNA.....	42
2.2. ASO's.....	43
2.3. ncRNA.....	44
2.4. siRNA	45
2.5. miRNA.....	46
2.6. Aptâmeros.....	48
3. Terapêuticas com RNA.....	49
3.1. Vacinas de mRNA.....	49
3.2. CRISPR-Cas – Edição de Genes	51
4. Principais Barreiras a Ultrapassar	53
4.1. Barreiras Extracelulares.....	53
4.2. Especificidade para Tecidos e Células-Alvo	54
4.3. Sistema Reticuloendotelial.....	54
4.4. Barreira Hematoencefálica.....	55
4.5. Internalização Celular e Libertação do Endossoma	55
4.6. Entrada Nuclear	56
5. Entrega de RNA no Meio Intracelular	57
5.1. Modificações Químicas e Estruturais.....	57
5.2. Vetores Virais.....	58
5.3. Nanopartículas Lipídicas	59
5.3.1. Lipossomas.....	59
5.3.2. SLN e NLC	61
5.4. Polímeros.....	62
5.5. Nanopartículas Híbridas Lípido-Polímero.....	64
5.6. Nanopartículas inorgânicas	64
5.7. Conjugação com Ligandos	65
6. Terapêuticas de RNA com Aprovação para Uso Clínico	66
7. Conclusões.....	69
Referências Bibliográficas	71
Anexo.....	86

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária



Orientação: Dra. Nadège Arminda Melo Couceiro

Lista de Abreviaturas

AINE's – Anti-inflamatórios não-esteróides

ANF – Associação Nacional das Farmácias

ARS – Administração Regional de Saúde

DCI – Denominação Comum Internacional

IMC – Índice de Massa Corporal

IVA – Imposto sobre o Valor Acrescentado

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

SNS – Serviço Nacional de Saúde

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

I. Introdução

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) tem como principal finalidade a formação multidisciplinar de profissionais especialistas nas várias áreas do circuito do medicamento. O estágio curricular do MICF pode ser dividido em duas etapas: uma que corresponde, obrigatoriamente, a um estágio em farmácia comunitária; e outra facultativa que corresponde a um estágio noutras áreas de intervenção no circuito do medicamento.

O contacto com o dia-a-dia de uma farmácia comunitária é o momento mais importante na formação de novos farmacêuticos. É aqui que nos é possível utilizar diariamente todos os conceitos interiorizados ao longo do curso e transpô-los para a prática profissional, tendo sempre como máxima a satisfação da necessidade dos utentes. Embora todos os processos do circuito do medicamento sejam importantíssimos, é na farmácia comunitária que acontece o momento mais importante e para o qual todas as outras áreas trabalham diariamente: a cedência correta e segura do medicamento ao seu utilizador final - o utente. Este é um momento que visa esclarecer todas as dúvidas relacionadas com o medicamento e, para isso, os farmacêuticos devem ser capazes de fornecer com clareza e fiabilidade todas as informações necessárias para que o utente saia da farmácia sem dúvidas e receios.

Por isso mesmo, as farmácias comunitárias têm-se demonstrado como um dos locais de maior relevância para o auxílio da comunidade, por ser um local de confiança onde os utentes podem contactar um profissional de saúde, sem custos e de forma mais informal. É, assim, o primeiro local que os utentes procuram quando necessitam de aconselhamento e, por isso, os farmacêuticos devem ser detentores de um conhecimento vasto e generalizado que permita esclarecer os utentes sobre qualquer assunto relacionado com a sua saúde.

No presente relatório, estão descritas todas as atividades desenvolvidas no âmbito do estágio curricular em farmácia comunitária, que decorreu na Farmácia Central Dra. Maria Leonor (doravante designada apenas por Farmácia Central), em Cantanhede, com início a 22 de março de 2021 e término a 6 de julho de 2021, contabilizando um total de 681 horas. A orientação do mesmo foi da responsabilidade da Dra. Nadège Couceiro, atual diretora técnica. Está redigido sob a forma de uma análise SWOT (do inglês *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), em que abordarei os pontos fortes e fracos, e as oportunidades e ameaças que considero relevantes salientar, durante a minha passagem pela Farmácia Central.

2. Análise SWOT

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Organização e Dinâmica Interna

O ponto mais forte a destacar, no que toca à realização do meu estágio, prende-se com a organização exemplar da farmácia e com a exigência na realização de tarefas. A interação contínua entre colaboradores era imprescindível para uma boa organização interna. Ao longo do dia, vão acontecendo várias situações das quais toda a equipa deve ter conhecimento, para que não ocorram incongruências na transmissão de informação aos utentes. A transmissão de informação credível e o rigor na dispensa correta e segura de medicamentos aos utentes é, por isso, uma das mais-valias a salientar na filosofia da Farmácia Central.

As responsabilidades das diversas tarefas da farmácia são distribuídas pelos vários colaboradores. Isto é, existe uma tabela que denomina uma pessoa responsável pelo controlo dos prazos de validade no final do mês, uma pessoa responsável pela realização de manipulados e gestão do laboratório, etc. Já as tarefas do dia-a-dia, como o atendimento ou a gestão e envio das encomendas diárias, eram de cariz rotativo entre os colaboradores, resultando numa maior motivação e dinâmica de trabalho.

A introdução da filosofia *Kaizen* é também um ponto a destacar. Esta visa estimular não só a rentabilidade e motivação da equipa no coletivo, mas também a nível individual. Consiste na melhoria contínua da organização dos vários espaços e métodos de trabalho da farmácia, com o objetivo de evitar o desperdício. Relativamente à receção e armazenamento de encomendas, existiam fitas separadoras delineando os espaços para os produtos ainda em receção e para os produtos que podiam ser armazenados. Os produtos eram guardados nas gavetas por ordem alfabética sendo que, para além dos comprimidos, existiam gavetas específicas para cremes e pomadas, pós, colírios, etc. Existiam também estantes destinadas exclusivamente a soluções e suspensões orais, produtos de IVA a 23% (como alguns suplementos alimentares), produtos de uso veterinário e para o armazenamento dos excedentes. Na zona de atendimento, os produtos de maior rotação (como alguns antibióticos, analgésicos e AINE's) eram colocados no *cockpit*, um armário colocado entre os balcões e sem visibilidade nem acesso para os utentes, levando a maior rapidez na dispensa e melhorando a dinâmica do atendimento. Na zona de exposição ao público, os diversos lineares de MNSRM, suplementos alimentares e dermocosméticos estavam organizados por indicação terapêutica. Em particular no caso dos produtos de dermocosmética, esta

organização resulta num aconselhamento mais fiável e dinâmico por parte dos colaboradores uma vez que, no mesmo linear, temos todos os produtos indicados para a mesma condição.

Ao longo do dia eram também realizadas reuniões de cerca de 5 a 10 minutos, para colocar toda a equipa a par das várias situações e discutir possíveis soluções para problemas, o que permite uma melhor integração, comunicação e troca de ideias entre os vários colaboradores. Todos estes aspetos desenvolvem na equipa uma maior união e motivação, acrescentando valor à farmácia e à relação final com o utente.

Como estagiário, fui desde início integrado como elemento da equipa, participando sempre em todas as reuniões e discussões. No que toca à realização de tarefas, foi-me dada a oportunidade de realizar, autonomamente e com sentido de responsabilidade, grande parte das várias tarefas do dia-a-dia, permitindo-me desenvolver capacidade de trabalho e autonomia nas minhas funções.

2.1.2. Localização da Farmácia

A Farmácia Central situa-se no centro da cidade de Cantanhede. Sendo este um ponto de referência da cidade, serve uma população-alvo muito diversificada, englobando pessoas de várias nacionalidades, diferentes estratos socioeconómicos e faixas etárias bastante alargadas. Estes aspetos levam a que a procura de serviços e produtos seja muito diversificada, o que contribuiu de forma muito positiva para o meu estágio.

2.1.3. Novo Módulo de Atendimento do SIFARMA®

As farmácias podem funcionar com vários sistemas informáticos, sendo o mais usual o SIFARMA 2000®. Nos últimos anos, a Glintt desenvolveu um novo módulo de atendimento do SIFARMA®, mais apelativo, fluido e intuitivo. Durante o meu estágio, essa mesma atualização foi implementada na Farmácia Central, sendo que todo o processo de atendimento ao público passou a ser efetuado neste novo módulo.

Considero este um ponto forte do meu estágio, uma vez que me permitiu aprender desde o início a trabalhar com esta atualização e estar em contacto com todas as mais-valias, mas ao mesmo tempo com todos os pontos menos bons. Por ser recente, existiam uma série de processos que não eram possíveis realizar e nos quais a Glintt trabalhava todos os dias, fazendo atualizações constantes ao sistema. Assim, contactei várias vezes o apoio ao cliente da Glintt para resolução de problemas, o que me ajudou a compreender melhor o funcionamento deste novo módulo.

2.1.4. Variedade de Tarefas Executadas

2.1.4.1. Receção de Encomendas e Gestão de Stocks

Na fase inicial do meu estágio, uma das minhas funções principais passava por rececionar e conferir as encomendas dos vários armazenistas. Este processo é feito com recurso ao sistema SIFARMA 2000[®] e consiste, sucintamente, na leitura dos códigos das várias embalagens para introdução no sistema, no controlo dos seus prazos de validade e na verificação dos preços de compra e das respetivas condições. Após finalizada a receção de encomendas, os produtos são armazenados segundo a regra “*first-expired, first-out*” nos vários locais referidos no ponto 2.1.1., de acordo com as respetivas formas farmacêuticas. Efetuei esta função de forma independente e considero que foi um ponto muito importante não só para perceber a dinâmica da rotação de *stocks* da farmácia, como também serviu de preparação para o atendimento ao público, uma vez que me fui familiarizando com as embalagens, nomes comerciais e princípios ativos associados.

O *stock* geral da farmácia é assegurado através de um sistema de *stocks* mínimos e máximos definidos para cada produto. Todos os dias são geradas automaticamente duas encomendas diárias que propõem o pedido dos vários produtos em falta, de forma a satisfazer os *stocks* máximos. Essas propostas são analisadas rigorosamente por um dos colaboradores, que gere e define quais os produtos efetivamente necessários encomendar. Não efetuei esta tarefa de forma independente, mas acompanhei de forma atenta a sua execução.

Ainda relativo à gestão de *stocks*, realizei a devolução de produtos aos armazenistas, sempre que estes se encontravam, por exemplo, com validade curta para dispensa ou com as embalagens danificadas, e regularizei por várias vezes as notas de crédito correspondentes a essas devoluções.

2.1.4.2. Atendimento aos Utentes

O atendimento pode ser dividido em dois momentos distintos: a prestação de serviços e o aconselhamento e/ou dispensa de medicamentos e outros produtos de saúde.

O primeiro engloba medições dos vários parâmetros químicos e biológicos, como a pressão arterial, colesterol total e glicémia, bem como pesagem e cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC). Aquando da realização destas medições, apercebi-me que é necessário ter um discurso empático, claro e inequívoco com o utente, esclarecendo quaisquer dúvidas sobre os objetivos terapêuticos e realçando sempre a importância da toma da medicação habitual para controlo dos valores. Tive sempre o cuidado de incentivar à prática de medidas

não farmacológicas nas várias patologias, bem como incentivar à medição frequente destes parâmetros, de forma a avaliar melhor a eficácia da terapêutica. Ainda relacionado com a prestação de serviços, acompanhei por várias vezes a administração de injetáveis, por parte de um farmacêutico.

Relativamente à dispensa de medicamentos e outros produtos de saúde, realizei autonomamente a dispensa de vários tipos de receitas (receitas eletrónicas, manuais, com psicotrópicos e receitas médico-veterinárias) e realizei o aconselhamento de MNSRM, suplementos alimentares, dispositivos médicos, dermocosméticos, entre outros produtos de venda livre. Ao realizar a dispensa de receitas, apercebi-me da especificidade de cada uma e da complexidade dos vários regimes e organismos de participação, que existem fora do SNS. Realço a particularidade das receitas com medicamentos psicotrópicos, uma vez que esta dispensa só pode ser efetuada mediante apresentação dos dados e documento de identificação do utente ou do adquirente (caso este último não seja o utente). Tanto na dispensa de receitas, como na dispensa de qualquer produto de venda livre, tentei sempre esclarecer todas as dúvidas relacionadas sobre o uso correto e seguro desses medicamentos e incentivei sempre à procura de conselhos por parte de um profissional de saúde, antes da auto-medicação.

Ao longo dos atendimentos, devido à falta de determinados produtos no *stock* da farmácia, foi necessária a realização de encomendas instantâneas de forma a satisfazer a necessidade dos utentes. Por vezes, foi também preciso contactar os diversos armazenistas via telefone, para consultar a disponibilidade desses mesmos produtos.

2.1.4.3. Preparação de Manipulados

Um dos papéis muito importantes de um farmacêutico passa pela preparação de medicamentos manipulados, i.e., medicamentos que são específicos e que não são produzidos em larga escala pelas indústrias, podendo ser preparados (mediante receita médica) pelo farmacêutico, no laboratório da farmácia.

Ao longo do meu estágio, tive a oportunidade de preparar vários manipulados, de entre os quais destaco a preparação de 400 g de pomada de Vaselina Salicilada + Diprosone NV®, indicada para o tratamento e controlo da psoríase e cuja ficha de preparação se encontra no Anexo I.

2.1.4.4. Conferência de Receituário

Atualmente, grande parte das receitas são eletrónicas, i.e., processadas a nível informático pelo médico e impressas ou enviadas via SMS para os utentes. No entanto,

pontualmente e em casos de exceção (como falência informática), podem ser prescritas receitas manuais. Nestas, o médico deve manuscrever obrigatoriamente vários pontos: o nome completo do utente; o regime de comparticipação e respetivo número de beneficiário associado; os princípios ativos, acompanhados de dosagem, número de comprimidos por embalagem, número de embalagens a ceder para cada princípio ativo e posologia; e ainda a data da prescrição e assinatura do médico. Estas receitas devem também conter a vinheta identificadora do médico prescriptor, bem como referência à sua especialidade, ao telefone e local da prescrição.

Por serem receitas manuais, a sua dispensa deve ser feita com atenção redobrada, uma vez que podem existir erros de leitura por parte do farmacêutico. No final do aviamento da receita, deve ser impresso no verso um comprovativo da dispensa efetuada, que deve ser arquivado na farmácia e onde constam todos os detalhes sobre os medicamentos dispensados ao utente e dos regimes de comparticipação a eles associados.

No final de cada mês, todas as receitas manuais devem ser conferidas, assinadas e carimbadas pelo farmacêutico responsável e enviadas para as respetivas ARS, para posterior validação e comparticipação pelo SNS. Nos casos de regimes de comparticipação fora do SNS, os comprovativos de dispensa das receitas devem ser também arquivados e enviados no final do mês para as sedes dos organismos de comparticipação, para que possam proceder ao pagamento das comparticipações à farmácia.

Ao longo do estágio, foram-me ensinados todos os aspetos relativos à conferência de receituário e foi-me dada a oportunidade de participar na conferência de receituário, com o auxílio de um farmacêutico. Tive também a possibilidade de assistir e ajudar na realização de um fecho de mês, onde são fechados os vários lotes de receitas eletrónicas e manuais dos vários organismos de comparticipação.

2.1.4.5. Entregas ao domicílio

Devido à propagação da pandemia provocada pelo vírus SARS-CoV-2, foram várias as farmácias que adotaram sistemas de entrega ao domicílio. Foi o caso da Farmácia Central, que disponibilizou entregas ao domicílio, de forma gratuita, a todos os utentes da freguesia de Cantanhede e de freguesias vizinhas. Durante o meu estágio, tive a oportunidade de realizar o atendimento telefónico e a dispensa ao domicílio a vários utentes.

2.1.4.6. Termohigrómetros

Como sabemos, pelas Boas Práticas de Distribuição, a temperatura e humidade relativa do ar nos locais de armazenamento dos medicamentos devem ser controladas. Para

isso, é obrigatório que cada farmácia tenha na sua posse um conjunto de termohigrómetros, colocados nos vários locais da farmácia e que permitam obter relatórios acerca dos valores destes dois fatores. Os termohigrómetros devem, por isso, estar colocados especificamente na zona do balcão de atendimento, no frigorífico, no laboratório e no armazém. Com a existência de entregas ao domicílio que necessitem da utilização de um automóvel, exige-se também que, durante a viagem, seja monitorizada a temperatura e humidade do veículo com outro termohigrómetro. Os relatórios devem ser obtidos, analisados e arquivados semanalmente.

Realizei, por várias vezes, a obtenção destes mesmos relatórios e analisei, com ajuda de um farmacêutico, se os valores se encontravam dentro dos parâmetros referência, sendo que nunca se registaram variações críticas.

2.1.4.7. Controlo de Prazos de Validade

A todos os produtos que entram no *stock* da farmácia, é-lhes atribuído no SIFARMA® o respetivo prazo de validade. No final de cada mês, eram retiradas do sistema informático as listagens dos produtos cuja validade expirava nos seis meses seguintes. Através destas listagens, era feita a verificação e correção dos prazos de validade e retiravam-se, para o armazém, os produtos cuja validade expirava no próprio mês. Aos outros produtos, cujas validades expiravam nos meses seguintes, eram associados descontos (apenas a produtos com IVA a 23%) por fim de prazo de validade, permitindo escoar algumas embalagens. Os produtos cujo prazo de validade era impróprio para utilização eram devolvidos aos armazenistas.

Ao longo do estágio participei frequentemente neste controlo mensal, permitindo-me não só conhecer melhor vários produtos e a sua indicação terapêutica, como perceber melhor a dinâmica de rotação dos vários produtos da farmácia.

2.1.4.8. Gestão de Psicotrópicos

Como referido acima, os psicotrópicos são medicamentos que obedecem a um controlo rigoroso por parte do INFARMED. Todos os meses, deve ser feita a gestão de psicotrópicos, que consiste na verificação de todas as entradas e saídas destes medicamentos do *stock* da farmácia e conferência de todos os documentos de dispensa de psicotrópicos, onde deveriam constar os dados do utente/adquirente, como o nome completo, número de cartão de cidadão e morada. Esta tarefa apenas pode ser executada pela Diretora Técnica ou por um farmacêutico substituto. Assim, observei atentamente os vários passos e ajudei na conferência do *stock* e dos documentos de dispensa.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Associação entre DCI e Nome Comercial

Ao longo do plano de estudos do MICEF, ao estudar os vários princípios ativos e casos clínicos, a grande maioria dos fármacos vêm descritos pela sua Denominação Comum Internacional (DCI) e não pelo nome do medicamento de marca.

Quando passamos para a prática em farmácia comunitária, na dispensa de receitas em que o medicamento vem descrito por DCI, deparamo-nos muitas vezes com situações em que o utente, não utilizando medicamentos genéricos, apenas conhece o nome comercial, criando-se uma situação um pouco constrangedora. No entanto, com o passar do tempo este problema tendeu a contornar-se com naturalidade, uma vez que durante a receção e armazenamento das encomendas, fui prestando atenção aos nomes comerciais e a que princípio ativo correspondiam, facilitando mais tarde a associação.

2.2.2. Aconselhamento de Produtos de Dermofarmácia e Cosmética

Um dos pontos fracos relativamente ao meu estágio prende-se com alguma falta de conhecimento prático no que toca a produtos de Dermofarmácia e Cosmética, o que acabou por dificultar alguns aconselhamentos. No plano de estudos do MICEF, considero que seria importante dar maior relevância ao aconselhamento em si, recorrendo a casos clínicos do dia-a-dia, que nos possam preparar melhor para o contacto direto com o utente.

Ainda assim, sempre que tive oportunidade despendi parte do meu tempo a procurar informação sobre as várias gamas de produtos, aplicações terapêuticas, quer através dos catálogos dos produtos das várias marcas, quer através de formações que tive a oportunidade de fazer. Esta dificuldade inicial no aconselhamento foi-se desvanecendo à medida que a prática no atendimento e o conhecimento dos produtos ia sendo maior.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Formação Contínua

Como referido no ponto anterior, uma das maiores dificuldades que, por norma, os farmacêuticos estagiários enfrentam está relacionada com o aconselhamento quer de MNSRM, quer de produtos de dermocosmética. Deve-se principalmente ao facto de não se conhecer o produto em causa, uma vez que para o mesmo efeito terapêutico existem dezenas de produtos equivalentes.

Para melhor satisfazer as necessidades dos utentes e melhorar a formação de todos os colaboradores, a Farmácia Central dispunha de uma hora diária de formação para cada

colaborador. Estas incluíam formações de marcas relacionadas com produtos de dermofarmácia e cosmética, ou formações sobre aconselhamento farmacológico em afeções menores.

Particpei ativamente nas várias horas de formação, tendo realizado, entre outras, um curso geral sobre os produtos da FILORGA® e uma formação sobre aconselhamento de suplementos alimentares dos laboratórios TILMAN, cujos certificados se encontram no Anexo II. Considero este ponto uma boa oportunidade, na medida em que enriqueceu fortemente o meu conhecimento e me deu capacidades para analisar e aconselhar de forma correta e segura os vários produtos que dispomos na farmácia.

2.3.2. Campanhas Promocionais Cartão Saúde e Rede Claro

As farmácias dependem bastante das vendas de MNSRM, suplementos alimentares e de dermocosméticos. Estes são uma grande percentagem do lucro total das farmácias e, para isso, é necessário promover a sua compra, por exemplo através de campanhas promocionais, que podem ser dinamizadas pela própria farmácia, pelo grupo de compras, pelos laboratórios, ou até mesmo pela Associação Nacional das Farmácias (ANF), através do Cartão Saúde.

A Farmácia Central, em particular, é aderente do programa Farmácias Portuguesas que, para além do sistema de pontos associados ao Cartão Saúde de cada utente, desenvolve todos os meses uma série de campanhas promocionais. A par com isto, o grupo de farmácias “Rede Claro”, do qual a Farmácia Central faz parte, desenvolve todos os meses um catálogo de promoções em produtos de venda livre.

Considero que a elevada dinâmica em torno das campanhas promocionais permite não só ao utente desenvolver empatia e fidelizar-se com a farmácia, como também permite à própria farmácia obter maior número de vendas e melhor imagem junto da comunidade. Este ponto mostrou-se uma boa oportunidade de desenvolver estratégias de promoção e técnicas para venda cruzada, bem como de me familiarizar melhor com várias gamas de produtos de venda livre e as suas indicações terapêuticas.

2.4. Ameaças

2.4.1. Produtos esgotados e faltas em stock

Devido à elevada procura por determinados produtos ou à colocação no mercado de quantidades insuficientes por parte dos laboratórios, surgem com frequência medicamentos esgotados e rateados. No momento do contacto com o utente, por vezes torna-se difícil fazer com que o mesmo perceba que o medicamento que procura se encontra esgotado. Na

grande maioria das vezes, existem, em *stock*, genéricos de outros laboratórios que podemos propôr ao utente para continuar a sua terapêutica diária. No entanto, quando estamos a falar de utentes de idade mais avançada, ou com alguma condição específica, esta proposta de troca é muitas vezes rejeitada. Nestes casos é necessário adequar o nosso discurso, fazendo-o de forma clara, calma e simplista, para que o utente possa perceber todos os aspetos que estamos a transmitir.

O elevado rigor durante o momento de envio das encomendas diárias e na gestão de *stocks* mínimos e máximos, apesar dos pontos positivos que apresenta para a gestão financeira da farmácia, pode também mostrar-se como uma ameaça à satisfação plena do utente. Este aspeto reflete-se no momento final de dispensa, em que frequentemente existiam produtos que não constavam do *stock* da farmácia e que tinham de ser reservados e encomendados para o utente, podendo provocar no mesmo uma sensação de insatisfação e ser uma ameaça para a imagem da farmácia. Para contornar estes aspetos, sempre que era necessário fazer encomenda instantânea de algum produto, verificava (e alterava, se necessário) o seu *stock* mínimo e máximo, para suprir as necessidades futuras dos utentes.

2.4.2. Iliteracia em saúde

A explosão da *internet* e das redes sociais, e mais recentemente a pandemia da COVID-19, veio despoletar uma problemática adicional no que toca à auto-medicação e aos conhecimentos sobre saúde. Hoje em dia, é possível encontrar facilmente toda e qualquer informação à distância de um clique. No entanto, grande parte dessa informação não é fidedigna, levando o utente a criar conceitos errados sobre determinada temática. Esta pré- formação de conceitos dificulta o diálogo e esclarecimento de dúvidas por parte do profissional de saúde, ainda mais se esse profissional se tratar de um estagiário, em quem os utentes tendem a depositar menor confiança.

Ainda assim, ao deparar-me com este tipo de situações, tentei sempre esclarecer ao máximo o utente e promover a consulta de profissionais de saúde sempre que existissem novas dúvidas sobre alguma patologia ou sobre a toma de algum medicamento.

3. Conclusão

A realização do estágio em farmácia comunitária foi um passo de enorme crescimento para mim, tanto a nível pessoal como profissional. O farmacêutico, como profissional de saúde, deve estar constantemente atualizado sobre as várias temáticas, o que torna esta área bastante desafiante, permitindo-nos contactar todos os dias com situações diferentes e para as quais temos de estar preparados.

O contacto diário com os utentes e com o dia-a-dia da prática farmacêutica fez-me perceber a importância e o papel relevante que o farmacêutico exerce na sociedade, por ser muitas vezes o primeiro contacto dos utentes com um profissional de saúde. Esta relação de confiança entre farmacêutico e utente torna a farmácia um local de valor no suporte à comunidade.

Realizar o estágio na Farmácia Central foi, sem dúvida, uma mais-valia em todos os aspetos. A equipa é bastante dinâmica e proativa, o que me fez aprender todos os dias e desenvolver autonomia, capacidade de trabalho e sentido crítico para avaliar as várias situações. Fui integrado como um membro ativo da equipa da farmácia e considero esse o ponto mais forte do meu estágio, uma vez que me foi dada a liberdade de executar e acompanhar todos os processos do dia-a-dia da farmácia comunitária e, assim, aprender com os erros e desenvolver melhores competências para o futuro.

Agradeço a toda a equipa da Farmácia Central - à Dra. Nadège, à Dra. Maria João, à Dra. Maria Inês, à Dra. Andreia, ao Dr. Óscar, à Susete, à Leonor e à D. Dulce - por toda a amabilidade com que me receberam e por me darem a oportunidade de aprender imenso com todos eles. Foram, sem sombra de dúvidas, um grande pilar na minha formação como farmacêutico.

Termino o estágio e o meu percurso académico agradecendo a todos os que me tornaram melhor profissional e sigo com a motivação e ambição de querer exercer cada vez melhor as Ciências Farmacêuticas na sociedade.

4. Casos Clínicos

Caso Clínico 1

Uma jovem de 28 anos dirige-se à farmácia, por se apresentar com queixas relativas ao início de uma infeção urinária. Dado que não tem disponibilidade para consultar um médico, pede alguma coisa que a possa ajudar no alívio dos sintomas e tratar a infeção. Mediante esta explicação, questionei a utente se este tipo de sintomas era recorrente, ao que a mesma respondeu afirmativamente.

Após consultar o historial clínico da utente, decidi ceder Systelle[®], um suplemento alimentar composto por 400 mg de extrato seco de Uva Ursina (*Arctostaphylos Uva-ursi folium*) que, devido à presença de arbutina (um derivado da hidroquinona), é capaz de exercer ação antisséptica e destabilizar as membranas das bactérias, levando à destruição da sua parede, mostrando-se útil no tratamento deste tipo de infeções. Informei a utente de que a posologia a efetuar deveria ser de 2 comprimidos 3 vezes por dia, durante 7 dias. Após os 7 dias, caso os sintomas não melhorassem, a utente deveria consultar um médico. Relativamente a medidas não farmacológicas, aconselhei a utente a fazer um consumo adequado de água, de modo a favorecer a diurese e aumentar a limpeza das vias urinárias. Aconselhei também a fazer uma higiene adequada e regular, recorrendo a produtos de higiene íntima.

Como sugestão complementar, após a toma do Systelle[®], aconselhei a utente a tomar Cysticlean[®] de forma regular. É um suplemento alimentar com base em extrato de Arando Vermelho (*Vaccinium vitis-idaea*), rico em proantocianidinas, que impedem a agregação das bactérias à parede da mucosa vaginal, sendo por isso muito útil na prevenção de futuras infeções. A posologia recomendada, neste caso, será de um comprimido por dia, preferencialmente à noite.

Caso Clínico 2

Uma senhora, com cerca de 50 anos, dirigiu-se à farmácia para pedir Gaviscon ou algo para a azia, pois apresentava queixas de barriga inchada e de eructação constante, referindo que se sentia muito presa e achava que seriam sintomas de azia.

Questionei a utente se tinha comido algo fora do normal e se sentia alguma sensação de ardor na garganta, ao que a mesma respondeu que não. Perguntei, também, há quanto tempo se queixava com estes sintomas e se tinha dificuldade em defecar. A esta pergunta a utente respondeu que há cerca de uma semana que não conseguia defecar e que os sintomas duravam há aproximadamente 4 ou 5 dias.

Após esta explicação, apercebi-me que não se trataria de um caso de azia, mas sim de um caso de obstipação pontual. Assim, após verificar o historial medicamentoso da utente, cedi Dulcolax® (bisacodilo 5 mg), um laxante de contacto, estimulador da motilidade intestinal, que promove a secreção de água e eletrólitos pela mucosa, amolecendo as fezes e facilitando a evacuação. Recomendei a toma de 1 comprimido ao deitar durante o prazo máximo de 5 dias, uma vez que pode causar habituação. Caso não melhorasse no prazo de 5 dias, a utente deveria consultar um médico. Como medidas não-farmacológicas, aconselhei a utente a fazer uma dieta rica em fibras e uma ingestão adequada de líquidos, bem como a fazer uma “reeducação” do intestino.

Caso Clínico 3

Um senhor, com cerca de 60 anos, vem à farmácia com o intuito de pedir algum medicamento para uma crise hemorroidária, queixando-se com muitas dores e irritação na região anal. Questionei o utente se já alguma vez tinha tido alguma crise, ao que o utente respondeu que era a primeira vez.

Após avaliar a situação e verificar o historial clínico do utente, aconselhei o mesmo a fazer uma terapêutica com duas abordagens distintas: tópica e sistémica. Para ação sistémica cedi Daflon® 1000, um MNSRM com base em bioflavonóides, que atua como venoativo reduzindo a inflamação do processo inflamatório venoso, uma vez que reduz a estase venosa e a venodilatação do plexo hemorroidário. A posologia a efetuar seria de 1 comprimido 3 vezes por dia, nos primeiros 4 dias, seguido de 1 comprimido 2 vezes por dia nos 3 dias seguintes e terminando com 1 comprimido diário como terapêutica de manutenção. Para tratamento a nível tópico, propus uma aplicação de manhã e à noite de Procto-Glyvenol®, um creme rectal composto por 50 mg/g de tribenosido (anti-inflamatório e venotrópico) e 20 mg/g de lidocaína (anestésico), cuja função principal é criar uma sensação de anestesia na região afetada, reduzindo a dor e a inflamação das veias hemorroidárias. Como medidas não-farmacológicas, aconselhei o utente a fazer uma adequada ingestão de fibras e líquidos, uma vez que a obstipação pode ser uma causa do desenvolvimento deste tipo de patologias. Recomendei também a aplicação de gelo numa fase mais crítica, com o objetivo de ajudar na redução da inflamação e da dor. Aconselhei ainda a lavagem adequada da região anal com água fria e com recurso a cremes lavantes específicos para a doença hemorroidária, que ajudam a prevenir o aparecimento de uma nova crise.

Referências Bibliográficas

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **Áreas profissionais: A Farmácia Comunitária.** [Consultado a 15 de setembro de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>
2. INFARMED - **Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de janeiro.** Lisboa, 1993.
3. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **Boas Práticas de Farmácia Comunitária – Norma geral sobre as infraestruturas e equipamentos.** Lisboa, 2015. [Consultado a 17 de setembro de 2021]. Disponível em: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/norma_geral_sobre_as_infraestruturas_e Equipamentos_20240917255ab147e12498f.pdf

Anexos

Anexo I – Ficha de Preparação de Manipulado

Farmácia Central Cantanhede

FICHA DE PREPARAÇÃO DE MANIPULADOS									
Vaselina Salicilada e Diprosone® Pomada									
Forma farmacéutica: Pomada Propriamente Dita					Data de preparação: 2021/06/10				
Número de Lote: 06/2021/01					Quantidade a preparar: 400 g				
Matérias primas	Nº Lote	Origem	Farmacopéia	Quantidade para 100 g	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Rubrica Operador e Data	Rubrica Supervisor e Data	
Diprosone® 0,05% pomada	1009287	MSD	Exc(1)	30,0 g	120,0 g		16/6/21	VC	
Ácido Salicílico	14063	JMGS	Exc(1)	5,0 g	20,0 g	20,009 g	16/6/21	VC	
Vaselina líquida	00170918	VENECIAR	Exc(1)	3,7 g	6,8 g	6,808 g	16/6/21	VC	
Vaselina sólida	808419	INACIS	Exc(1)	60,3 g	253,2 g		16/6/21	VC	
Material de Embalagem		Nº Lote	Origem	Nome Utilizador: _____					
2 caixas plásticas brancas		-	Brinc., Acessórios de Farmácia Lda.	Nome Prescritor: _____					
PREPARAÇÃO:							Rubrica Operador e Data	Rubrica Supervisor e Data	
1. Limpar a placa de espátula, e a espátula com álcool a 70%.							16/6/21	VC	
2. Preparar o papel de pesagem - fazer 4 viracos para não se perder produto pesado.							16/6/21	VC	
3. Colocar papel de pesagem na balança analítica e tarar.							16/6/21	VC	
4. Pesar 253,2 g de vaselina branca para o papel de pesagem.							16/6/21	VC	
5. Colocar na placa de espátula.							16/6/21	VC	
6. Usar a Placa de Aquecimento para 100°C.							16/6/21	VC	
7. Colocar copo de precipitação na balança analítica e tarar.							16/6/21	VC	
8. Pesar 6,80 g de vaselina líquida na balança analítica.							16/6/21	VC	
9. Colocar copo de precipitação com a vaselina líquida na placa de aquecimento.							16/6/21	VC	
10. Preparar o papel de pesagem - fazer 4 viracos para não se perder produto pesado.							16/6/21	VC	
11. Colocar papel de pesagem na balança analítica e tarar.							16/6/21	VC	
12. Pesar 20 g de ácido salicílico para o papel de pesagem.							16/6/21	VC	
13. Colocar na placa de espátula.							16/6/21	VC	
14. Retirar o copo com a vaselina líquida do aquecimento.							16/6/21	VC	
15. Incorporar aos poucos a vaselina líquida em ácido salicílico e misturar.							16/6/21	VC	
16. Incorporar aos poucos, por espátula, os tubos de Diprosone® pomada no preparado anterior.							16/6/21	VC	
17. Incorporar aos poucos, por espátula, a vaselina sólida no preparado anterior.							16/6/21	VC	
18. Espátula até obtenção de pomada de coloração branca homogênea.							16/6/21	VC	
19. Proceder ao controlo de qualidade.							16/6/21	VC	
20. Embalar e rotular.							16/6/21	VC	
21. Anexar a esta ficha de preparação uma cópia assinada e carimbada do rótulo da embalagem dispensada.							16/6/21	VC	
CONDIÇÕES DE CONSERVAÇÃO:									
Conservar em embalagem bem fechada à temperatura ambiente.									
PRAZO DE UTILIZAÇÃO:									
3 meses									
CONTROLO DE QUALIDADE									
Ensaio	Especificação	Resultado							
		Conforme	Não Conforme	Rubrica Operador					
1. Características Organolépticas									
Cor	Pomada de Cor Branca	X							
Olor	Inodora	X							
Aspecto	Aspecto Homogêneo	X							
2. Conformidade com a definição da monografia "Preparações Semi-sólidas Cutâneas" da F.P.X.									
3. Quantidade		X							
Tutar previamente o recipiente de dispensa e, em seguida, pesar o recipiente com o respectivo conteúdo.									
Aprovado		[X]							
Emitido:		[Assinatura]							
Supervisor:		[Assinatura]							
Rubrica do Director Técnico:		[Assinatura]							
Data:		16/6/21							

Anexo II – Certificados de Formações

LABORATOIRES
FILORGA
PARIS

CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO

Certifica-se que Francisco Freire participou na formação **CURSO GERAL: ABORDAGEM DE TODOS OS PRODUTOS**, que decorreu no dia 6 de Maio de 2021 às 10 horas, via plataforma ZOOM, com duração de duas horas.


CRISTINA PEREIRA
 Farmacêutica Formadora FILORGA

* LABORATÓRIO FRANCÊS DE MEDICINA ESTÉTICA

 **CERTIFICADO**

Certifica-se que o **Dr. Francisco Freire**, colaborador da **Farmácia Central**, assistiu à formação do Laboratório Tilman, no dia 16 de abril de 2021, com a duração de 30 minutos.

Drs. Catarina Almeida
 Farmacêutica
 Self-Chat Manager
TILMAN FARMACIA
 Rua da Liberdade, 110
 1100-014 Lisboa
 Tel. +351 21 310 00 00
 Email: tilman@tilmanfarmacia.com


 [Assinatura]

**Relatório de Estágio em Distribuição Grossista de
Medicamentos**



Orientação: Dra. Olga Cristina Correia Simões

Lista de Abreviaturas

BPD – Boas Práticas de Distribuição

DGAV – Direção-Geral da Alimentação e Veterinária

IF – Indústria Farmacêutica

LI – Logística Inversa

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

PVF – Preço de Venda à Farmácia

PVP – Preço de Venda ao Público

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

I. Introdução

O último semestre do 2º ciclo de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) é destinado a estágio curricular, em que os estudantes têm a oportunidade de colocar em contexto prático os conhecimentos que foram adquiridos ao longo dos cinco anos académicos. Nesta etapa, abrem-se várias portas de diferentes áreas e entidades onde os estudantes poderão começar a sua carreira profissional, após finalizarem o seu percurso estudantil. Na nossa instituição de ensino, é-nos dada a oportunidade de, para além de um estágio em Farmácia Comunitária, realizar um (ou mais) estágio(s) numa outra área, como a Indústria Farmacêutica (IF), Assuntos Regulamentares, Farmácia Hospitalar ou a Distribuição por Grosso de Medicamentos. Como considero que ter experiências profissionais diversificadas é importante para a valorização do nosso currículo, decidi aproveitar esta oportunidade e ver de perto a realidade da distribuição de medicamentos.

“Distribuição por grosso” é definida, de acordo com o n.º I do Artigo 3.º do Decreto-Lei n.º 176/2006¹, de 30 de agosto, como “atividade de abastecimento, posse, armazenagem ou fornecimento de medicamentos destinados à transformação, revenda ou utilização em serviços médicos, unidades de saúde e farmácias, excluindo o fornecimento ao público”. Baseia-se num conjunto de operações logísticas que garante um acesso mais facilitado, rápido e com uma reduzida taxa de erros, aos produtos de saúde. Os distribuidores grossistas são, por isso, entidades auditadas pelo INFARMED no início da sua atividade, com emissão do Certificado de Boas Práticas de Distribuição (BPD) de medicamentos de uso humano, revalidado de 5 em 5 anos. Assumem-se assim como o intermediário legal entre os laboratórios da IF e as farmácias e restantes unidades de saúde, garantindo desta forma um serviço de qualidade.

Sempre me cativou conhecer a forma como toda esta atividade logística está montada e o papel fulcral que o farmacêutico nela exerce, como especialista do medicamento. O farmacêutico deve garantir que se cumprem todas as normas de conservação, armazenamento, qualidade e de distribuição, ou seja, o farmacêutico poderá delegar tarefas, mas será sempre responsável pelo cumprimento de todos os requisitos do Regulamento das BPD. Senti, por isso, que estagiar na Plural - Cooperativa Farmacêutica, C.R.L. seria uma oportunidade de valor a acrescentar à minha formação.

A minha passagem pela Plural - Cooperativa Farmacêutica, C.R.L., com orientação da Dra. Olga Simões, teve início no dia 11 de janeiro de 2021, e terminou no dia 12 de março de 2021, completando um total de 352 horas, e estará descrita no presente relatório sob a

forma de uma análise SWOT (do inglês *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*). Neste descreverei os seus pontos fortes e pontos fracos, referindo as diversas oportunidades e ameaças relativas ao meu estágio.

2. Plural - Cooperativa Farmacêutica, C.R.L.

A Plural - Cooperativa Farmacêutica^{2,3,4}, C.R.L. (doravante designada apenas como 'Plural') é uma cooperativa com 46 anos de existência, que opera como armazenista e distribuidor grossista de medicamentos, sendo uma das principais seis no mercado farmacêutico português, com uma quota de mercado de cerca de 13%. Resultou da fusão de três cooperativas da região centro - Cofarbel, C.R.L. e Farcentro, C.R.L. na Farbeira, C.R.L. É uma empresa com sede no armazém de Coimbra e que conta com outras cinco plataformas logísticas espalhadas pelo país - Maia, Covilhã, Cacém, Faro e, mais recentemente, na ilha da Madeira, através da parceria com a FarMadeira. Ainda durante o estágio, a empresa adquiriu os ativos da Udifar, em Lisboa.

3. Análise SWOT

3.1. Pontos Fortes

3.1.1. Forte Automatização e Organização

Todas as plataformas logísticas da Plural, em particular o armazém de Coimbra que tive a oportunidade de conhecer, dependem de um sistema informático de gestão (SAP). Este permite que toda a atividade de gestão, transversal a essas plataformas, esteja conjugada num só *software*. Isto possibilita que, com um conjunto de comandos informáticos específicos, se consiga aceder a toda a informação necessária, como informações relativas à gestão de *stocks*, compras, vendas, faturação, recursos humanos, departamento financeiro, receção de mercadoria, distribuição, etc.

Durante o meu estágio, passei grande parte do meu tempo na secção das Reclamações e da Logística Inversa (LI). A primeira trata das reclamações feitas pelas farmácias, relativamente aos pedidos de encomenda, onde se analisam as notas de devolução das farmácias e, mediante o motivo da devolução, credita-se (ou não) determinado produto a essas mesmas farmácias. Caso o produto esteja dentro dos parâmetros exigidos pela Plural para a retoma da sua comercialização, o produto pode entrar novamente em *stock*, sendo que todos os movimentos de entrada de mercadoria necessitam de autorização pelo Diretor Técnico. Na eventualidade de o produto estar fora de prazo, danificado ou com outras condições mais específicas que o impeçam de retornar ao *stock* de venda, será enviado para

a Logística Inversa (LI) e devolvido ao fornecedor.

A LI é responsável pelo trânsito inverso dos produtos, i.e., é responsável por devolver aos laboratórios todos os produtos que existam no *stock* da Plural, mas que já não estejam em condições de serem vendidos, e todos os produtos que tenham sido devolvidos pelas farmácias e não possam reintegrar o circuito do medicamento. Nestes motivos estão incluídos produtos fora de prazo, embalagens danificadas, remarcação de PVP e até circulares de suspensão de comercialização ordenadas por fabricantes ou por autoridades de regulamentação como INFARMED ou DGAV, no caso de suplementos alimentares e produtos de uso veterinário.

Qualquer uma destas áreas, e todas as outras por onde passei em todo o armazém, estão em constante dependência umas das outras, tornando toda a atividade dentro do armazém um ciclo enorme com várias etapas. Ora, tudo isto é apenas possível devido à elevada organização do armazém, quer a nível logístico, quer a nível de *software*, que permite que todas as peças funcionem dia-a-dia, de forma contínua.

A forte automatização também é um dos pontos fortes da Plural, contando com: uma máquina de aviamento automático (SCHAEFER A-Frame), que avia perto de 40 000 unidades/hora, e onde são colocados os produtos de maior rotação; um “carrossel” vertical (SCS) de arrumação com 20 000 compartimentos, onde são colocados os produtos com menor rotação; e um sistema de transporte de baques, controlado informaticamente, que permite que cada baque, a partir do momento em que saia da estação de controlo, “saiba” os locais de armazenamento onde se encontram os produtos da encomenda a ele associada. Isto possibilita a colocação de operadores logísticos em zonas específicas do armazém, de forma a trabalharem numa área mais reduzida. Cada operador logístico também dispõe de um aparelho de radiofrequência que, após a leitura do código de barras do baque, lhe fornece todas as informações sobre localização e quantidade do produto pedido, e a que baque está associado, minimizando desta forma erros na colocação dos produtos.

Todo este investimento em sistemas informáticos e máquinas automáticas, permite que o *picking* (aviamento) das encomendas seja feito de forma muito mais rápida, eficaz, organizada e com uma baixa percentagem de erros.

3.1.2. Dimensão da Empresa

Desde cedo percebi que um dos grandes pontos fortes da Plural se prende com o elevado grau de compromisso e exigência para com as farmácias. Esta procura por fazer bem e satisfazer ao máximo as necessidades dos seus clientes, através do número elevado de serviços que é capaz de oferecer, é uma excelente mais-valia para o sucesso e crescimento

da empresa, que se tem afirmado como o principal armazenista, em Portugal, de capital unicamente nacional.

A minha passagem pela empresa permitiu-me rapidamente perceber a sua dimensão, que desconhecia ser tão alargada, desde logo pelo elevado rigor de logística e organização que apresenta, pelo número de colaboradores que emprega (atualmente com 305 colaboradores), como pelo número de encomendas que são aviadas por dia e a sua distribuição por todo o território nacional.

3.1.3. Boas Práticas de Distribuição e Política de Qualidade

A distribuição de medicamentos às farmácias deve obedecer a um conjunto de requisitos de Boas Práticas de Distribuição (BPD), de modo que se assegure a estabilidade e qualidade do medicamento.⁵ Estes incluem, por exemplo, controlo ao nível da luz, humidade e temperatura. Este último aspeto tem uma importância acrescida, uma vez que a temperatura deve ser mantida tanto no armazenamento, como no transporte. Como sabemos, existem medicamentos que necessitam de condições de armazenamento específicas e, nestes casos, as temperaturas (no armazém e no transporte) devem ser mantidas entre os 2°C e os 8°C. Para cumprir com estes requisitos, estão implementados sistemas de controlo de humidade e temperatura, em todos os armazéns e meios de transporte da Plural, permitindo um controlo exato destes fatores ao longo do dia e das várias rotas de distribuição e a análise de eventuais desvios.

Este controlo rigoroso das BPD reflete-se através da exemplar política de qualidade exigida a todos os colaboradores da Plural. O Manual da Qualidade, ao qual tive acesso, demonstra exatamente toda a organização, responsabilidade e rigor na conduta de trabalho de todos os que trabalham na empresa.

O contacto direto com a realidade da Plural permitiu-me entender melhor os vários conceitos relativos às BPD, como a existência de um Sistema de Gestão da Qualidade que permite um controlo e acompanhamento de todos os processos, a existência de instalações e equipamentos adaptados e suficientes para assegurar o armazenamento e distribuição dos medicamentos em boas condições, a existência de um plano de auditorias e autoinspeções, etc. Estes aspetos mostraram-se relevantes tanto no decurso do meu estágio, como para a minha vida profissional, uma vez que me proporcionaram a obtenção de competências e conceitos bastante importantes para a minha formação.

3.2. Pontos Fracos

3.2.1. Visão sobre o Medicamento

Muitas das funções que desempenhei ao longo do estágio, na qualidade de operador logístico, prendiam-se maioritariamente com o *picking* das encomendas, através da colocação de medicamentos nos baques respetivos, sempre com auxílio de um aparelho de radiofrequência. Este é um processo que deve ser realizado no mais curto espaço de tempo possível, para que as encomendas possam sair, de forma que cheguem atempadamente às farmácias. Aqui, o contacto com milhares de embalagens por dia, aliado à rapidez de execução e ao trabalho que se torna bastante rotineiro, leva a que os operadores de logística acabem por ter uma visão sobre o medicamento um pouco leviana, encarando-o apenas como mais um número e mais uma embalagem.

Desde muito cedo que me apercebi desta forma de olhar para o medicamento apenas como um mero produto. No entanto, sempre que o trabalho me permitia, despendia algum tempo a analisar os diversos medicamentos que me iam passando pelas mãos, as suas características e indicações terapêuticas, permitindo que me familiarizasse com muitos desses produtos, que viria mais tarde a ter acesso na farmácia comunitária.

Enquanto futuro farmacêutico e especialista do medicamento, considero que este foi um dos pontos fracos do meu estágio, uma vez que, durante o MICF, somos formados de maneira a ter sempre uma visão muito científica e “cuidadosa”, olhando para o medicamento como um bem precioso e essencial para o bem-estar e saúde das pessoas, visão essa que parece perder-se um pouco, neste contexto da distribuição por grosso de medicamentos.

3.2.2. Fraca Aplicação de Conhecimentos Científicos

Tal como em qualquer outra área farmacêutica de contacto direto com o medicamento, o INFARMED exige, de acordo com a Deliberação n.º 77-A/CD/2021, que qualquer distribuidor por grosso de medicamentos em atividade em Portugal designe um Diretor Técnico, que seja obrigatoriamente um farmacêutico inscrito na Ordem dos Farmacêuticos.⁵ Este é um ponto de elevada importância, uma vez que, se trabalhamos diretamente com produtos farmacêuticos, só um farmacêutico (na qualidade de especialista do medicamento) é capaz de assegurar o cumprimento das BPD e garantir a qualidade desses mesmos produtos.

Apesar de tudo isso, e de serem asseguradas todas essas condições, o Diretor Técnico acaba por exercer maioritariamente funções relacionadas com gestão e logística,

sendo escassa a aplicação dos conhecimentos científicos que são abordados ao longo dos cinco anos do MICF.

3.3. Oportunidades

3.3.1. Perceção da Dinâmica Entre Farmácias e Laboratórios

Um armazém de distribuição grossista exerce um papel de intermediário entre os laboratórios da IF e as farmácias, comprando produtos à IF e vendendo às farmácias, com uma determinada margem de comercialização. No entanto, esta dinâmica não é assim tão literal, e existem um conjunto de outros acontecimentos dos quais eu não estava a par, antes de iniciar o estágio.

As farmácias podem, por exemplo, contactar diretamente os laboratórios, definir um conjunto de condições de compra e adquirir uma certa quantidade de produtos (a maioria das vezes com condições mais favoráveis, do que comprando a um grossista), e pedir que esse laboratório entregue na Plural, para que possa depois ser enviado para a farmácia. A este processo dá-se o nome de “Vendas Diretas”, em que o laboratório estabelece as condições de venda diretamente com a farmácia, e a Plural é apenas responsável pelo armazenamento e transporte entre ambos. Em grande parte das Vendas Diretas, os principais intervenientes são os grupos de farmácias, isto é, um conjunto de várias farmácias que se reúnem formando um grupo, grupo esse que irá definir as condições de compra com o laboratório (que podem incluir descontos, produtos de bonificação, etc.). Assim, os grupos conseguem comprar uma maior quantidade de produtos, o que lhes permite obter melhores descontos e maior rentabilidade. Então, após comprarem diretamente aos laboratórios, os grupos definem qual o distribuidor grossista em que gostariam que esse produto ficasse armazenado. Sempre que qualquer farmácia do grupo necessitar desse produto, basta encomendar à Plural, que esse produto será retirado do “stock de grupo”, e será faturado à farmácia com as condições que o grupo definiu com o laboratório.

O contacto com estas diferentes atividades fez-me perceber que existe uma dinâmica crescente, no que toca à ligação direta entre os laboratórios da IF e as farmácias, e considero que foi uma oportunidade muito relevante no decurso do meu estágio. A perceção desta dinâmica permitiu-me adquirir conhecimentos de extrema importância para a prática da farmácia comunitária.

3.3.2. Familiarização com Produtos Farmacêuticos

No decurso do MICF, e maioritariamente nas unidades curriculares relacionadas com a Farmacologia, são-nos ensinados vários princípios ativos e qual a sua indicação terapêutica.

Essa abordagem é focada na Denominação Comum Internacional, e não tanto no nome comercial a que está associado o princípio ativo. Na passagem para a prática em Farmácia Comunitária, a associação imediata entre nome comercial e princípio ativo revela ser um desafio, onde acabamos por demorar algum tempo até conseguir associar um nome comercial à sua indicação terapêutica.

Enquanto operador logístico no armazém da Plural, lidei de perto com um *stock* de produtos centenas de vezes superior ao *stock* de uma farmácia comunitária. Este contacto direto com um leque alargado de medicamentos e produtos farmacêuticos, muitos deles desconhecidos, mostrou-se uma oportunidade importante na familiarização com esses mesmos produtos, respetivas embalagens, nomes comerciais e indicações terapêuticas.

3.4. Ameaças

3.4.1. Papel do Farmacêutico na Distribuição Grossista

Tal como abordado acima, o INFARMED exige que a pessoa responsável pela gestão técnica e da qualidade de um armazém grossista de medicamentos seja designada por Diretor Técnico, a qual deve ser obrigatoriamente um farmacêutico com inscrição válida na Ordem dos Farmacêuticos. Este é responsável por garantir o cumprimento do Sistema de Gestão da Qualidade e das BPD, funções que requerem conhecimentos maioritariamente relacionados com gestão, logística e gestão de recursos humanos, noções que poderiam ser abordadas mais aprofundadamente ao longo do MICF.

Excluindo o cargo de Diretor Técnico, não se exige que nenhuma das outras posições sejam forçosamente ocupadas por farmacêuticos. No caso concreto da Plural, tanto o Diretor Geral, como o Diretor de Compras, bem como alguns gestores de clientes, são igualmente farmacêuticos, o que penso ser uma mais-valia para o sucesso da Plural, no que toca a conhecimentos relativos ao mercado farmacêutico.

No entanto, considero que o papel do farmacêutico na distribuição, com responsabilidades apenas ao nível da gestão e logística, pode tornar-se numa ameaça à valorização da nossa profissão, enquanto conhecedores máximos de toda a ciência envolvida no ciclo do medicamento.

3.4.2. Margens de Comercialização

Um dos principais clientes das farmácias, e consequentemente das cooperativas farmacêuticas, é o Estado, representando cerca de 50% da faturação das farmácias. Como organização com poder legislativo, cabe a ele definir os regimes de comparticipação e os preços e margens de comercialização dos medicamentos. Com esse papel do lado do

Estado, e dado que uma vasta percentagem dos produtos vendidos pelos distribuidores grossistas são medicamentos sujeitos a receita médica com PVP definido, a oportunidade de obter melhores margens de comercialização torna-se bastante restritiva. As sucessivas diminuições nestas margens, impostas pelo Estado, diminuem drasticamente os lucros possíveis pelas distribuidoras. Num estudo sobre o impacto do setor da Distribuição Farmacêutica em Portugal, realizado em 2019, estima-se que a margem líquida sobre o total do PVP ronde os 1,8%.⁶ Exemplificando, num medicamento cujo PVP seja de 10,00€, o distribuidor farmacêutico recebe 0,18€. Relativamente à estrutura de custos, 93% do PVF (Preço de Venda à Farmácia) é respeitante ao custo do próprio produto, e os restantes 7% distribuídos entre armazenamento, transporte, e outros encargos. Aliado a todas estas adversidades, ainda se adicionam os investimentos que têm de ser feitos, de forma a manter toda a atividade a funcionar em conformidade com as BPD.

Como futuro farmacêutico, não posso deixar de me concentrar nesta questão como uma ameaça ao futuro da distribuição grossista, que tem vindo a sofrer quedas nos volumes de vendas nos últimos anos, devido essencialmente à limitação das margens de comercialização.

4. Conclusão

As saídas profissionais do MICE são muito alargadas e diversas. Para melhor percebermos as várias etapas do circuito do medicamento, é necessário termos contacto real com a prática das várias atividades do setor farmacêutico.

A oportunidade de estagiar na Plural foi uma etapa de enorme relevância no meu percurso, uma vez que me permitiu adquirir competências e novos conhecimentos muito enriquecedores para o meu futuro profissional, enquanto farmacêutico e especialista do medicamento. Apesar da distribuição grossista de medicamentos ser uma área onde a intervenção direta de farmacêuticos é reduzida, é muito importante perceber tanto o papel fulcral que o farmacêutico exerce em assegurar o cumprimento das BPD e a estabilidade do medicamento, como toda a logística, organização e estrutura de custos que está por trás de um armazém grossista. Quer para a prática em farmácia comunitária, quer para funções em qualquer outra área de atividade farmacêutica, é sempre relevante perceber as diferentes etapas do circuito do medicamento e todas as práticas que se devem cumprir de forma a garantir a estabilidade e qualidade do medicamento.

Por último, resta-me deixar um enorme obrigado a toda a equipa da Plural, em especial à Dra. Olga Simões na qualidade de minha orientadora de estágio, pela forma amável como me acolheram e se mostraram sempre dispostos a ensinar e a transmitir todos os conhecimentos possíveis. Senti-me sempre em casa e levo deste estágio muito boas recordações e amizades.

Referências Bibliográficas

1. MINISTÉRIO DA SAÚDE – **Decreto-Lei n.º 176/2006 de 30 de agosto**. Lisboa: Diário da República n.º 167/2006, Série I. (2006).
2. PLURAL – **Quem Somos: História** [Acedido a 10 de março de 2021]. Disponível na Internet: https://www.plural.pt/quem-somos/historia_16
3. PLURAL – **Quem Somos: Política e Missão** [Acedido a 10 de março de 2021]. Disponível na Internet: https://www.plural.pt/quem-somos/politica-e-missao_14
4. PLURAL – **Quem Somos: A Nossa Cultura** [Acedido a 10 de março de 2021]. Disponível na Internet: https://www.plural.pt/quem-somos/a-nossa-cultura_15
5. CONSELHO DIRETIVO DO INFARMED, I.P. – **Deliberação n.º 77-A/CD/2021**. Lisboa: INFARMED, I.P. (2021)
6. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **Caracterização e Avaliação do Impacto da Distribuição Farmacêutica em Portugal** [Acedido a 3 de março de 2021]. Disponível em: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/adifa_estudo_impacto_setor_congressonacional2019_15888152555ca614cc0ee45.pdf

Monografia

“Terapêuticas com RNA: Estratégias de Entrega Intracelular”

Orientação: Professor Doutor Luís Miguel Santos Loura

Resumo

Atualmente, graças ao rápido desenvolvimento científico e tecnológico dos últimos anos, é possível (e cada vez mais imperativo) pensar em novas formas de terapia, que tenham a capacidade de melhorar e tratar doenças consideradas não-tratáveis. A utilização de RNA em terapêutica tem vindo a ganhar um enorme interesse por parte da comunidade científica, devido ao elevado potencial em chegar a alvos moleculares aos quais a terapêutica convencional não permite aceder. No entanto, para que possam ser entregues a nível intracelular, as moléculas de RNA enfrentam uma série de barreiras e desafios que necessitam de ser ultrapassados para que possa haver um efeito terapêutico significativo. O desenvolvimento de estratégias de entrega efetivas e seguras, como a utilização de ligandos específicos ou de nanopartículas à base de lípidos ou polímeros, permitiu a aprovação de vários fármacos, ao longo dos últimos anos, mostrando o impacto positivo que estas terapêuticas têm no mundo atual. Também o aparecimento de novas técnicas que podem possibilitar a edição de genes, como a técnica *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR), despoletaram uma enorme expansão no mundo da terapia génica, por poder vir a permitir a cura definitiva de doenças. Ao longo deste trabalho serão, então, sumariadas as aplicações dos vários tipos de RNA atualmente utilizados em terapêutica, dando especial ênfase às estratégias que permitem a sua entrega a nível intracelular, aos mais recentes progressos e às perspetivas futuras.

Palavras-chave: Barreiras; Entrega Intracelular; Nanopartículas; RNA; Terapia Génica.

Abstract

Currently, thanks to the substantial scientific and technological development of these recent years, it is possible (and increasingly imperative) to think of new forms of therapy that have the capacity to improve and treat diseases considered intractable. The application of RNA in therapeutics has been gaining enormous interest from the scientific community, due to the high potential to reach molecular targets that conventional therapy does not allow access. However, in order for them to be delivered at intracellular level, RNA molecules face a wide number of barriers and challenges that need to be overcome, so that we can achieve a significant and valid therapeutic effect. The development of effective and safe delivery strategies, such as the use of specific ligands or nanoparticles based on lipids or polymers, has allowed the approval of several drugs over the past few years, showing the positive impact that these therapies could have in today's world. Also the appearance of new techniques that can make gene editing possible, such as the *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) technique, triggered a huge expansion in the world of gene therapy, as it could allow the definitive cure of diseases. Throughout this work, the applications of the various types of RNA currently used in therapeutics will then be summarized, with special emphasis on strategies that allow their delivery at the intracellular level, the most recent advances and future perspectives.

Keywords: Barriers; Gene Therapy; Intracellular delivery; Nanoparticles; RNA.

Lista de Abreviaturas

Ago2 – proteína argonauta-2

ASGR – recetor da asialoglicoproteína

ASO – oligonucleótidos antisense

BHE – barreira hematoencefálica

Cas – proteínas associadas à CRISPR

CRISPR – *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

DNA – ácido desoxirribonucleico

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

DOPE – 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

DSB – quebra de dupla cadeia

DSPC – 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina

dsRNA – RNA de cadeia dupla

EMA – *European Medicines Agency*

FDA – *U.S. Food & Drug Administration*

GalNAc – *N-acetilgalactosamina*

GNP – nanopartículas à base de ouro

gRNA – RNA guia

HDR – Reparação Dirigida por Homologia

LDL – lipoproteína de baixa densidade

LNA – *Locked Nucleic Acids*

lncRNA – RNA não-codificante de cadeia longa

LNP – Nanopartículas lipídicas

LPHN – nanopartículas híbridas lípido-polímero

MHC – Complexo Major de Histocompatibilidade

miRNA – microRNA

mRNA – RNA mensageiro

ncRNA – RNA não-codificante

NGF – fator de crescimento nervoso

NHEJ – União de Extremidade Não-Homóloga

NLC – veículos lipídicos nanoestruturados

NP – nanopartículas

ORF – *Open-Reading Frame*

PAM – *Protospacer-Adjacent Motif*

PAMAM – poliamidoamina

PBAE – poli(β -aminoester)

PDMAEMA – poli(2-(dimetilamino)etil metacrilato)

PEG – polietilenoglicol

PEI – polietilenimina

PLGA – poli(ácido lático-co-ácido glicólico)

PMO – Oligómeros Morfolino Fosforodiamidato

RISC – *RNA-induced Silencing Complex*

RNA – ácido ribonucleico

RNAi – *RNA-interference*

RNase H – ribonuclease H

RNP – ribonucleoproteína

SARS-CoV-2 – Síndrome Respiratório Agudo Grave do Coronavírus 2

shRNA – *short-hairpin RNA*

siRNA – *short-interference RNA*

SLN – nanopartículas lipídicas sólidas

SNC – Sistema Nervoso Central

sncRNA – RNA não-codificante de cadeia curta

TTR – transtirretina

UTR – região não-codificante

I. Introdução

A inovação tecnológica e os novos conhecimentos em ciência abriram a porta para um novo mundo de terapias, com potencial totalmente renovador e revolucionário. Muitas das patologias que se pensavam ser impossíveis de tratar passam agora a estar na mira das inovações terapêuticas.

O uso de RNA em terapia gênica abre um leque alargado de alvos até então inatingíveis, permitindo o silenciamento de genes, responsáveis por determinada doença, ou permitindo a expressão de outros genes, que codifiquem uma determinada proteína, benéfica no combate de infecções, por exemplo. Os enormes avanços na biotecnologia permitiram nos últimos anos conhecer os vários tipos de RNA que existem no nosso organismo, e perceber de que forma é que podem ser quimicamente modificados para se obter uma resposta eficaz.

É fácil perceber o potencial deste tipo de terapêuticas e o contributo que podem trazer para muitas pessoas que sofrem de doenças sem tratamento. Ainda assim, há um conjunto de vários obstáculos que têm de ser ultrapassados, relacionados com a entrega de RNA. Ao contrário das terapêuticas convencionais, as terapêuticas com ácidos nucleicos exigem que estes sejam entregues em compartimentos intracelulares, para conseguirem exercer atividade farmacológica e atingir os seus alvos. Para além disso, são na grande maioria moléculas de tamanho elevado, e com carga elétrica significativa, que as torna incapazes de penetrar as membranas celulares.¹

Assim, torna-se essencial construir e desenhar estratégias de entrega para estas moléculas, que lhes permitam quebrar todas estas barreiras. O objetivo é conseguir criar um veículo que seja estável a nível plasmático, seletivo para os tecidos e células-alvo, com alta afinidade para os seus recetores, e com baixo risco de toxicidade para o indivíduo.²

Atualmente, existem vários fármacos aprovados quer pela FDA, quer pela EMA, com modificações químicas específicas, que usam particularmente revestimento com nanopartículas lipídicas, polímeros, ou ligandos específicos para conjugação com determinados recetores.

Ao longo deste trabalho, serão abordados, nas várias secções, os vários tipos de RNA, a sua possível utilização em terapêutica, bem como as barreiras que devem ser ultrapassadas para uma entrega eficaz de RNA no interior da célula. Falaremos de seguida, com maior destaque, dos materiais que possibilitam essa mesma entrega e dos fármacos que obtiveram aprovação para uso clínico. Por fim, faremos uma breve discussão acerca da evolução deste tipo de terapêuticas e das principais perspetivas para o futuro.

2. Tipos de RNA

2.1. mRNA

A forma prototípica de RNA é o chamado RNA mensageiro (mRNA), uma cadeia simples de ácidos nucleicos, transcrita a partir de uma cadeia-mãe de DNA, posteriormente traduzida em proteínas, por ação dos ribossomas. As cadeias de mRNA são constituídas por uma extremidade 7'-metilguanossina, ligada por uma ligação 5'-5'-trifosfato³, duas regiões não codificantes (5'-UTR e 3'-UTR), a região que codifica para a proteína, definida como *Open-Reading Frame* (ORF), e uma extremidade 3' poliadenilada, que confere estabilidade e eficiência na tradução.^{1,4}

Antes de chegar à molécula de mRNA funcional, obtém-se um estágio intermédio, que se designa por pré-mRNA, constituído por intrões e exões, transcritos da molécula de DNA. Este pré-mRNA sofre um processo de *splicing* alternativo em que os intrões, por serem elementos não codificantes, são removidos, restando apenas os exões na cadeia de mRNA funcional. Erros no processo de *splicing* podem dar origem a mutações, responsáveis pelo aparecimento de várias doenças. Temos como exemplo a Atrofia Muscular Espinhal, caracterizada pela exclusão do exão 7 dos genes SMN1 e SMN2. Através da modulação do processo de *splicing* alternativo, é possível incluir de novo este exão no mRNA dos genes SMN1 e SMN2, possibilitando a correta codificação da proteína SMN, fulcral para a formação e manutenção das junções neuromusculares, e para a função motora dos indivíduos.

Por si só, livres no plasma, os mRNA são moléculas carregadas negativamente e muito suscetíveis à ação de nucleases, sendo facilmente degradadas antes de exercerem ação farmacológica. A resposta farmacológica que induzem é transitória, uma vez que não necessitam de integração no genoma do indivíduo, por conseguirem tirar partido da maquinaria celular para serem traduzidas.

O papel que exercem na formação e expressão proteica permite-nos modificar química e estruturalmente as cadeias de mRNA, de forma a conseguir expressar proteínas de interesse terapêutico, por exemplo na vacinação contra doenças infecciosas ou cancerígenas. O nosso sistema imunitário é bastante sensível, e facilmente inicia uma resposta contra moléculas estranhas. Uma molécula de mRNA que codifique para um antígeno específico pode desencadear uma resposta pelo sistema imunitário, que se torna capaz de reconhecer o mesmo antígeno, aquando de uma infeção.

Com os últimos avanços relativos a terapias de edição de genes, as moléculas de mRNA ganham também muito interesse, por terem a capacidade de codificar proteínas

importantes para o processo de edição genética, como proteínas associadas ao sistema CRISPR, e endonucleases que permitem a correção de mutações e a alteração de sequências específicas de genes.

2.2. ASO's

Oligonucleótidos Antisense (ASO's) são cadeias simples de RNA (ou DNA)⁵, tipicamente mais pequenas que o mRNA (~ 4-10 kDa)⁶, desenhadas especificamente para se ligarem por hibridização Watson-Crick a um gene de interesse.⁷

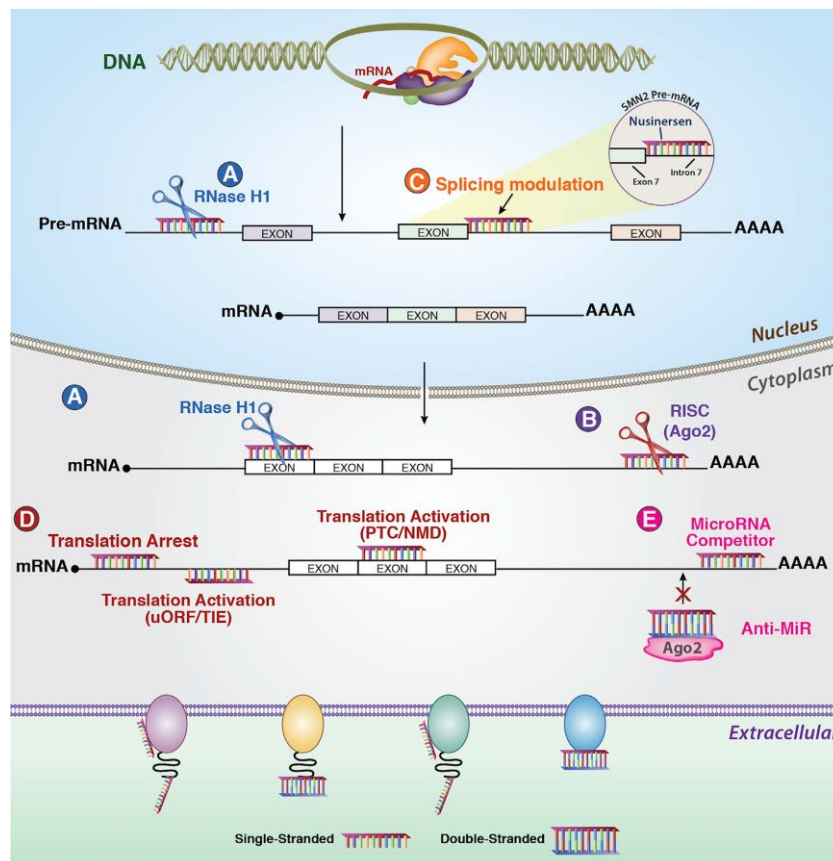


Figura 1 | Mecanismos de Modulação de Expressão Gênica dos ASO's.⁸

Legenda: A) ASO's ligam-se por complementaridade ao mRNA ou pré-mRNA, induzindo a clivagem mediada pela RNase H. B) Inibição da tradução de mRNA por siRNA, via mecanismo RISC-Ago2 (ver secção 2.4.). C) Modulação de *splicing* (*splicing modulation*), através de ligação ao pré-mRNA, induzindo a inclusão ou exclusão de intrões e exões. D) Regulação do processo de tradução, através de impedimento estereoquímico (inibição), ligação a componentes inibidores (uORF e TIE). E) Ligação específica a miRNA ou aos seus locais de ligação, regulando a atividade de um miRNA específico.

Esta ligação permite-lhes modular a expressão gênica por dois tipos distintos de mecanismos (Fig. 1). O primeiro é ligando-se por complementaridade a uma cadeia de mRNA ou pré-mRNA, transformando essa região numa dupla cadeia. Esta ligação desencadeia a ativação da ribonuclease H (RNase H) que, como assume que existe um erro de construção, cliva essa mesma cadeia, impedindo a tradução. O segundo tipo de mecanismos envolve uma ligação por complementaridade, mas que não envolve a indução da degradação do RNA. São exemplos: a modulação do processo de *splicing*, por ligação de

ASO's a um pré-mRNA, regulando a inclusão/exclusão de intrões e exões; a inibição da tradução através de impedimento estereoquímico do local de ligação de mRNA ao ribossoma; ou a ativação da tradução, pela ligação a componentes inibidores, como as 'fases de leitura abertas a montante', em inglês *upstream Open-Reading Frames* (uORF).

Como podemos ver pelo modo de atuação dos ASO's, conseguimos perceber que envolvem ação em meio citoplasmático, mas também a nível do núcleo, por atuar nos pré-mRNA. Este mostra-se como outro grande desafio relativamente à entrega deste tipo de moléculas: atravessar a membrana nuclear.

2.3. ncRNA

As moléculas de RNA podem ser divididas em dois grandes grupos: RNA's com capacidade de codificar proteínas, como o mRNA; e RNA's sem capacidade codificante, comumente conhecidos como *non-coding RNA's* (ncRNAs). Na verdade, apenas uma pequena parte do nosso genoma é transcrita em RNA's com capacidade codificante, sendo que cerca de 80% resulta em ncRNA's que exercem uma enorme atividade reguladora em múltiplos mecanismos celulares (p. ex. regulação de processos de transcrição e tradução).^{8, 9} Podem ser categorizados de duas maneiras diferentes, consoante o número de nucleótidos presente nas cadeias. Os *short non-coding RNA's* (sncRNA's) podem ir de cadeias curtas até cadeias com 200 nucleótidos, enquanto os *long non-coding RNA's* (lncRNA's) têm cadeias acima de 200 nucleótidos.¹¹

A desregulação dos ncRNA's está associada ao desenvolvimento de várias doenças, particularmente tumores, pelo que o controlo da expressão génica destas moléculas pode ser uma estratégia útil para terapêutica.¹² Para além da intervenção em processos celulares, ultimamente têm sido associados a um importante papel na regulação da expressão génica, uma vez que apresentam a capacidade de regular vários genes em simultâneo. Esta diferenciação tem suscitado interesse por parte da Ciência, para o desenvolvimento de terapêuticas com base em ncRNA's para doenças complexas e heterogéneas, como é o caso de alguns tumores.¹³

Atualmente, ainda não existem lncRNA's em transição para ensaios clínicos, pela sua difícil modulação *in vivo*.¹¹ Os sncRNA, como os microRNA (miRNA) e os *short-interfering* (siRNA), são os ncRNA com maiores avanços em estudos clínicos e, por isso, serão abordados de forma mais aprofundada nas secções seguintes.

2.4. siRNA

Short-Interference RNA (siRNA) são pequenas cadeias duplas de RNA, que levam à ativação de um mecanismo de silenciamento de expressão gênica, designado *RNA Interference* (RNAi). A expressão de siRNA (Fig. 2) deriva do processamento de um precursor, por norma uma cadeia dupla de RNA (dsRNA) ou um *short-hairpin* RNA (shRNA), que serve como substrato à endoribonuclease Dicer, formando um duplexo de siRNA com cerca de 22 nucleótidos.¹⁴ Este é incorporado num complexo proteico de silenciamento gênico, denominado *RNA-induced Silencing Complex* (RISC), onde as duas cadeias são divididas em cadeia *sense* e cadeia *antisense*. A cadeia *sense* serve como promotora da ligação da cadeia *antisense* ao RISC. A primeira é posteriormente degradada após a ligação ao complexo, enquanto a cadeia *antisense*, que contém uma extremidade 5' termodinamicamente mais instável¹⁵, permanece ligada à proteína Argonata-2 (Ago2) do RISC. A Ago2 facilita a hibridização da cadeia *antisense* com o RNA-alvo, e contém um domínio com atividade semelhante à da RNase H.¹⁶ Forma-se, então, um complexo que vai identificar a cadeia de mRNA complementar à cadeia *antisense*, clivando-a, impedindo a tradução e silenciando a sua expressão gênica.

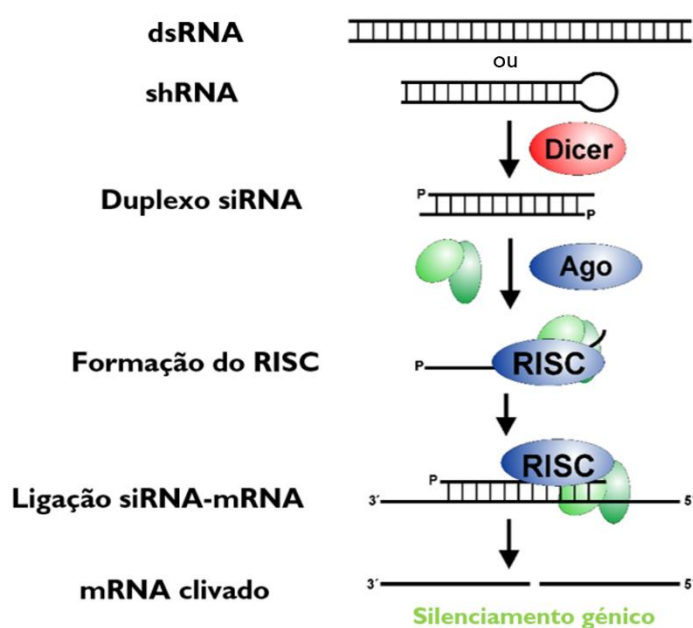


Figura 2 | Mecanismo de formação e ação de siRNA. (Adaptado de siRNA.gene-quantification.info, s.d., “**siRNA and qRT-PCR**”. <https://www.gene-quantification.de/si-rna.html>)

A presença do RISC unicamente no citoplasma, torna os siRNA muito mais efetivos contra alvos citoplasmáticos, quando comparados com os ASO's, uma vez que a RNase H reside predominantemente no núcleo.¹⁷

Para que o mecanismo de RNAi seja ativado e para que as moléculas de siRNA sejam incorporadas no RISC, é necessária a entrega em meio intracelular. Assim, é preciso

desenvolver veículos e estratégias de entrega que permitam ultrapassar alguns obstáculos que impedem a entrega efetiva nos alvos a que se destinam. Estas estratégias devem conferir estabilidade contra as nucleases, evitar a ativação do sistema imunitário, diminuir a *clearance* renal, evitar interações não-específicas com proteínas plasmáticas e outras células, permitir a saída dos vasos e passagem através das membranas celulares para a entrada na célula-alvo, e possibilitar a incorporação nos complexos proteicos.

Atualmente, as novas abordagens às terapêuticas com siRNA começam a ser direcionadas a doenças oncológicas (p. ex. melanoma metastático ou cancro pancreático), já com alguns ensaios clínicos de fase I e II a decorrer.¹⁸

2.5. miRNA

Os microRNA (miRNA) são exemplos de sncRNA, i.e., RNA's não codificantes de cadeia curta. São cadeias simples de RNA endógeno, de 18 a 25 nucleótidos, que exercem um papel muito importante na regulação da expressão génica¹³ (ao nível da pós-transcrição). Apesar de serem isentos de capacidade codificante, os níveis de expressão de miRNA têm impacto na regulação de vários processos celulares (como a proliferação, diferenciação celular e apoptose)¹⁹ e no desenvolvimento de várias doenças, como cancro, doenças neurodegenerativas ou doenças cardiovasculares.²⁰

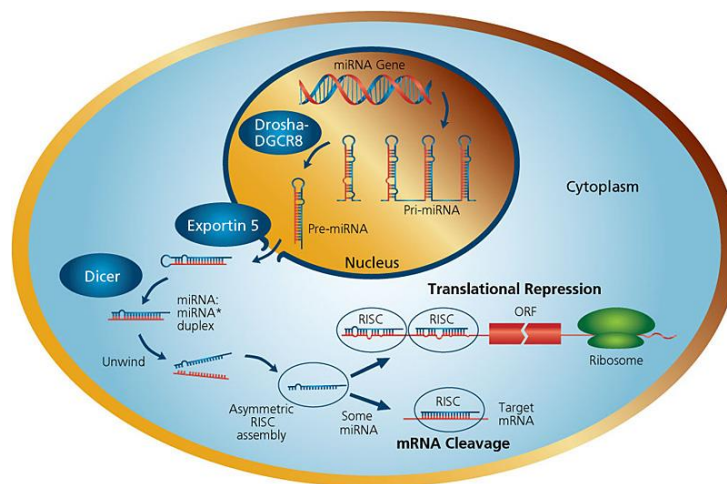


Figura 3 | Mecanismo de formação e ação de miRNA. (Adaptado de SIGMA ALDRICH, s.d., “miRNA (microRNA) Introduction”. <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/technical-documents/technical-article/genomics/gene-expression-and-silencing/mirna-introduction>)

O seu mecanismo de formação e ação (Fig. 3) inicia-se com a transcrição do gene de miRNA, mediada pela RNA polimerase II, onde se obtém um miRNA primário (pri-miRNA), com uma extremidade em gancho. Este será, de seguida, transformado em pre-miRNA, por ação de um complexo enzimático Droscha-DGCR8, ainda no interior do núcleo. Será, então, exportado para o citoplasma pela proteína Exportina-5, onde vai sofrer clivagem pela

endoribonuclease Dicer, levando à formação de um “duplexo” de miRNA-miRNA, com cerca de 22 nucleótidos. Uma das cadeias deste duplexo ligar-se-á à proteína Ago2, ativando o complexo RISC e todo o mecanismo de RNAi subsequente, enquanto a outra cadeia será degradada.^{5, 20} Após ligação ao RISC, a molécula de miRNA ligar-se-á, preferencialmente, à região não-codificante 3'UTR do mRNA alvo, resultando na sua inativação e/ou degradação.²²

Apesar de, em parte, o mecanismo de ação dos miRNA ser semelhante ao dos siRNA, existem, entre eles, algumas diferenças que devemos entender. A principal, e que confere um potencial terapêutico mais alargado aos miRNA, é o facto de a sua complementaridade junto do RNA-alvo ser apenas parcial, com ligação mínima de 2-8 nucleótidos.²³ A esta zona de ligação mínima dá-se o nome de *seed-region*, e está usualmente localizada na extremidade 5' do miRNA. Esta ligação parcial permite que uma molécula de miRNA seja capaz de regular a expressão de vários transcritos, uma vez que reconhece a cadeia de RNA-alvo sem necessitar de 100% de complementaridade.²⁴ Portanto, a ação dos miRNA ligados ao RISC pode resultar na repressão da tradução (caso a complementaridade miRNA-mRNA seja reduzida), ou resultar na clivagem do mRNA-alvo, via mecanismo RNAi (caso haja complementaridade total).¹⁹

Os níveis de miRNA em circulação apresentam excelentes características como biomarcadores para a deteção precoce e prognóstico de evolução de alguns tumores.²² Contudo, apesar dos avanços tecnológicos permitirem o desenvolvimento de técnicas cada vez mais acessíveis e rápidas, o uso de miRNA como biomarcador ainda se encontra numa fase inicial, devido à baixa reprodutibilidade destes ensaios, no que toca à transposição para o uso clínico.²⁵

Por estarem intimamente envolvidos na patogénese de várias doenças, muitas delas letais, o controlo da expressão destes miRNA é essencial. Nos casos específicos de alguns tumores, em que grande parte dos miRNAs têm uma expressão mais reduzida, comparando com o tecido saudável, pode ser necessário restabelecer a expressão de miRNAs de supressão tumoral, introduzindo miRNAs sintéticos. No entanto, pode, também, ser necessário inibir a expressão de miRNA oncogénicos, através do uso de inibidores (como os ASO).²⁶

Tal como os siRNA, os miRNA são fracamente absorvidos pelas células, dada a sua carga negativa. O tempo de semi-vida é também muito reduzido, uma vez que são moléculas muito suscetíveis à inativação e degradação por parte de nucleases. Para contornar estes obstáculos, é também necessário desenvolver estratégias que permitam a entrega em meio citoplasmático, de forma efetiva e segura. Nos casos em que o objetivo é aumentar a

expressão de determinado miRNA, é necessário garantir que não ocorre a sobreexpressão do mesmo, para que não ocorram fenômenos de toxicidade.²⁷

2.6. Aptâmeros

Aptâmeros são cadeias simples e curtas de DNA ou RNA, desenhadas para se ligarem com grande afinidade a um determinado alvo, de forma análoga a um anticorpo. São, por isso, moléculas isentas de capacidade de regulação da expressão gênica.

São obtidos e isolados a partir de um método denominado *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* (SELEX). Consiste numa vasta “biblioteca” de sequências aleatórias de ácidos nucleicos, em que as extremidades dessas cadeias são fixas, de modo a permitir a ação da transcriptase reversa (RT), e em que a região central da sequência, usualmente até 40 nucleótidos, é aleatória. O processo começa com a incubação de parte desta “biblioteca” de ácidos nucleicos, previamente amplificada por RT-PCR, com a proteína alvo. As sequências que se ligarem à proteína alvo são separadas das restantes, amplificadas novamente por RT-PCR, sendo que as cadeias de DNA resultantes dessa amplificação serão de novo incubadas com a proteína, dando início a um novo ciclo. Este processo é repetido até 12 vezes, até se obter uma boa quantidade de aptâmeros de RNA com afinidade suficiente para a proteína alvo.²⁸

A sua utilização é muitas vezes comparada à de um anticorpo. No entanto, existem algumas diferenças e vantagens, no que toca à utilização de aptâmeros. São moléculas de síntese mais rápida (entre 2 a 8 semanas pelo método SELEX), fácil e económica, com maior estabilidade quanto a temperatura e prazo de validade. Além destas vantagens de carácter operacional, apresentam-se como moléculas com um tamanho muito mais reduzido, quando comparadas com anticorpos, com uma afinidade e especificidade mais elevada, uma vez que apenas irão ligar-se ao seu alvo específico, ao passo que diferentes anticorpos podem ligar-se ao mesmo antígeno, e têm ainda um potencial terapêutico muito mais alargado, visto que os alvos podem ser desde iões a células inteiras.²⁹

Para além do seu possível uso como inibidores de alvos específicos, são normalmente utilizados como ligandos de outras moléculas de RNA ou de nanopartículas, direcionando RNA's com fins terapêuticos ao seu alvo.³⁰ Um dos exemplos da sua utilização como fármaco inibidor é o Macugen® (pegaptanib), que se tornou em 2004 o primeiro aptâmero de RNA a ser aprovado pela FDA, para o tratamento da Degenerescência Macular Neovascular (húmida) relacionada com a idade (DMI), pela sua ação inibidora do VEGF₁₆₅ (fator de crescimento do endotélio vascular). Entretanto, devido ao aparecimento de anticorpos, como o ranibizumab, que obteve melhores resultados clínicos e maior

rentabilidade financeira, acabou por ser descontinuado em 2011 na União Europeia (UE), a pedido dos Laboratórios Pfizer.^{27, 30}

3. Terapêuticas com RNA

O desenvolvimento científico e tecnológico permitiu que, ao longo dos últimos anos, as terapêuticas com RNA mostrassem um potencial tremendo na prática clínica, uma vez que são capazes de expressar proteínas terapêuticas, alterar níveis de expressão de determinados genes, intervir em processos de transcrição e tradução de genes, e participar na edição génica.⁶

Apesar de as possíveis aplicações práticas serem muito vastas (a maioria abordadas brevemente neste trabalho), ao longo deste capítulo vamos dar destaque particular a dois tipos de utilização de RNA: as vacinas de mRNA, pelo contexto pandémico que vivemos e pela sua pertinência no mundo atual; e a técnica CRISPR, pelo enorme potencial demonstrado em atingir a cura definitiva de doenças, através da edição de genes.

3.1. Vacinas de mRNA

Nos últimos anos, as vacinas de mRNA têm suscitado muito interesse e desenvolvimentos por parte da comunidade científica, devido à capacidade que têm de codificar um número alargado de antígenos, pela facilidade de construção e modificação das sequências nucleotídicas, e pela facilidade na produção em larga escala.³² São o meio mais rápido e eficaz de controlar e prevenir a proliferação de doenças infecciosas, como aquelas provocadas pelo vírus *Influenza* e mais recentemente pelo SARS-CoV-2, mas são também muito promissoras na imunoterapia do cancro. O objetivo principal nesta abordagem é usar a maquinaria celular do hospedeiro para expressar o antígeno pretendido, de forma a estimular um conjunto de respostas humorais e imunológicas que levem à produção de anticorpos neutralizantes e de linfócitos B e T citotóxicos.³³

Apresentam algumas vantagens relativamente às vacinas de vetores virais, ou de DNA, nomeadamente o facto de não causarem infeção nem necessitarem de integração no genoma do hospedeiro, e por apenas necessitarem de transpor a membrana celular para conseguir expressão, ao contrário das vacinas de DNA e de plasmídeos que necessitam de entrada no núcleo.³⁴

Existem dois mecanismos de desenvolvimento de vacinas de mRNA, atualmente em uso (Fig. 4). O primeiro baseia-se em RNA's sem capacidade de amplificação, i.e., uma simples sequência de nucleótidos com um ORF que codifica para o antígeno de interesse, rodeado por regiões 5' e 3'-UTR, uma extremidade 5'-Cap e uma extremidade 3'

poliadenilada, que conferem estabilidade contra nucleases, maior tempo de semi-vida e melhor acessibilidade ao ribossoma. Após entrada na célula, a cadeia de mRNA é libertada do endossoma e está pronta a ser traduzida.^{34, 35} Além deste, existe um segundo mecanismo que tira partido do genoma de vírus de cadeia simples positiva, particularmente de alphavírus. São designadas vacinas de mRNA auto-replicativo, e diferenciam-se das anteriores por serem capazes de se amplificarem no interior das células, aumentando os níveis e duração da expressão do antígeno e consequente imunogenicidade.³⁷ O RNA resultante da transcrição, denominado Replicação, contém dois ORF's diferentes, em que um codifica para proteínas não-estruturais essenciais à amplificação do RNA em ambiente citoplasmático, e o outro, que anteriormente codificaria para proteínas estruturais, é substituído por uma sequência que codifica o antígeno de interesse.^{31, 34} Em ambos os mecanismos, após a expressão do antígeno, este será degradado pelo proteossoma num peptídeo que será expresso à superfície da membrana celular pelo Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC I e II), ativando o reconhecimento e resposta imunológica por parte dos linfócitos B e T citotóxicos (CD4⁺ e CD8⁺).³⁶

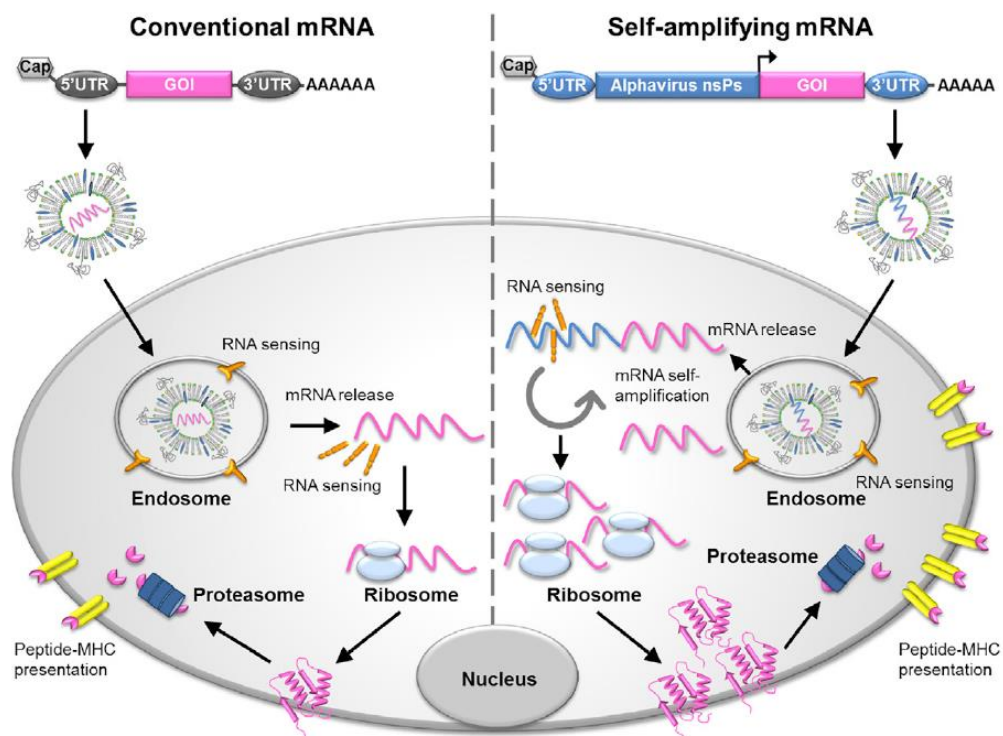


Figura 4 | Mecanismo de Ação de Vacinas Convencionais (Conventional mRNA) vs Vacinas Auto-Replicativas (Self-amplifying mRNA).³⁴

Este mecanismo de auto-amplificação permite uma expressão do antígeno mais acentuada, prolongada e em menor dose. No entanto, para que seja possível exercer esta atividade amplificadora, os replicões deixam de conseguir suportar algumas das modificações estruturais necessárias para melhorar a sua resistência e estabilidade, o que pode tornar-se

uma desvantagem.³⁷ O tamanho da sequência nucleotídica também se pode colocar como um problema adicional, uma vez que as vacinas de mRNA auto-replicativo originam replicões com maior número de pares de bases, quando comparados com os convencionais (~ 10 kb versus ~ 2-3 kb), o que pode originar maiores dificuldades na internalização efetiva dentro das células.³⁸ Na tabela, que se encontra no anexo I, podemos verificar as vantagens e desvantagens da utilização de ambos os mecanismos, bem como da utilização das vacinas de mRNA face às restantes.

As vacinas de mRNA também se apresentam mais seguras no que toca a efeitos adversos, uma vez que não necessitam de células de cultura, nem codificam para proteínas virais. Apesar da segurança demonstrada nos ensaios clínicos, há alguns aspetos a ter em conta. Em particular, o possível facto de induzirem respostas potentes por parte do interferão tipo I, associadas quer a inflamação, quer a autoimunidade, e o facto de poderem induzir a formação de trombos e edemas pela presença de RNAs extracelulares. Assim, serão sempre necessários mais estudos e desenvolvimentos, de forma a melhorar a eficácia e segurança desta terapêutica.³⁹

Com dezenas de vacinas de mRNA candidatas em ensaios clínicos e pré-clínicos, torna-se evidente que a tecnologia deste modelo de terapêutica se mostra muito promissora para o tratamento e prevenção de cancro e doenças infecciosas.⁴⁰ Até ao momento, as únicas vacinas de mRNA autorizadas para uso humano receberam uma autorização para uso emergencial, pela EMA e pela FDA, para a utilização no combate à pandemia da COVID-19.^{40, 41}

3.2. CRISPR-Cas – Edição de Genes

Um dos grandes objetivos da Ciência é conseguir alcançar a cura definitiva de uma determinada doença, através de modificação e edição génica *in vivo*, na correção de mutações indutoras de patologias, por exemplo.⁴³ A técnica *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) é um enorme passo na perseguição desse objetivo.

Na Natureza, este sistema existe como um mecanismo procariótico de imunidade adaptativa, utilizado para clivar sequências estranhas de ácidos nucleicos.⁴⁴ São divididos em duas classes diferentes: os sistemas CRISPR-Cas de classe I, que utilizam um complexo de várias proteínas Cas (CRISPR-associated proteins); e os de classe II, que utilizam uma única proteína, com vários domínios.⁴⁵ Exatamente por utilizarem apenas uma proteína, são sistemas mais simples de manipular e, por isso, são até agora os sistemas preferenciais para ensaios.

Até à data, o sistema com mais estudos e avanços em ensaios clínicos é o CRISPR-Cas9, que utiliza uma cadeia simples de RNA como guia (guide RNA – gRNA) para direcionar a proteína Cas9, uma endonuclease obtida de várias bactérias (como a *Streptococcus pyogenes* – SpCas9 – e a *Staphylococcus aureus* – SaCas9), até ao DNA-alvo e induzir a clivagem da dupla cadeia, denominada em inglês, *Double-Strand Break* (DSB).^{45, 46} Esta proteína reconhece a cadeia-alvo através da ligação a uma sequência com cerca de 20 nucleótidos do DNA-alvo, que será complementar a outra sequência do mesmo tamanho do gRNA, que pode ser modificada pelo investigador. Esta interação (Cas9-DNA) apenas é possível devido à presença de uma sequência curta de nucleótidos, adjacente ao local de clivagem, denominada *Protospacer-Adjacent Motif* (PAM), que estimula a clivagem através da ação de dois domínios da Cas9, RuvC e HNH (Fig. 5), que dão origem à quebra da dupla cadeia (DSB).^{47, 48} Habitualmente, esta clivagem é feita a uma distância de 3 nucleótidos do PAM.⁵⁰

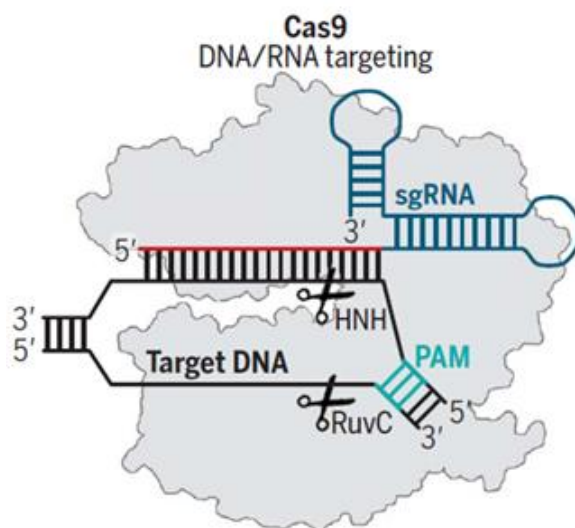


Figura 5 | Esquema do sistema CRISPR/Cas9.⁵¹

Após a quebra da cadeia-alvo pela Cas9, podem ser ativados dois mecanismos endógenos de reparação (Fig. 6). Um deles, designado União de Extremidade Não-Homóloga (NHEJ – em inglês *Non-Homologous End Joining*), origina inserções e/ou deleções aleatórias no local específico de reparação⁵², estando muito associado à ocorrência de erros. O outro, denominado Reparação Dirigida por Homologia (HDR – do inglês *Homology-Directed Repair*), utiliza uma cadeia de DNA exógena como “dadora”, cujas extremidades são homólogas às extremidades da DSB, permitindo alterações específicas a nível da sequência nucleotídica, ou inserções de sequências um pouco mais extensas, maioritariamente através de plasmídeos ou de vetores virais de DNA.⁵³

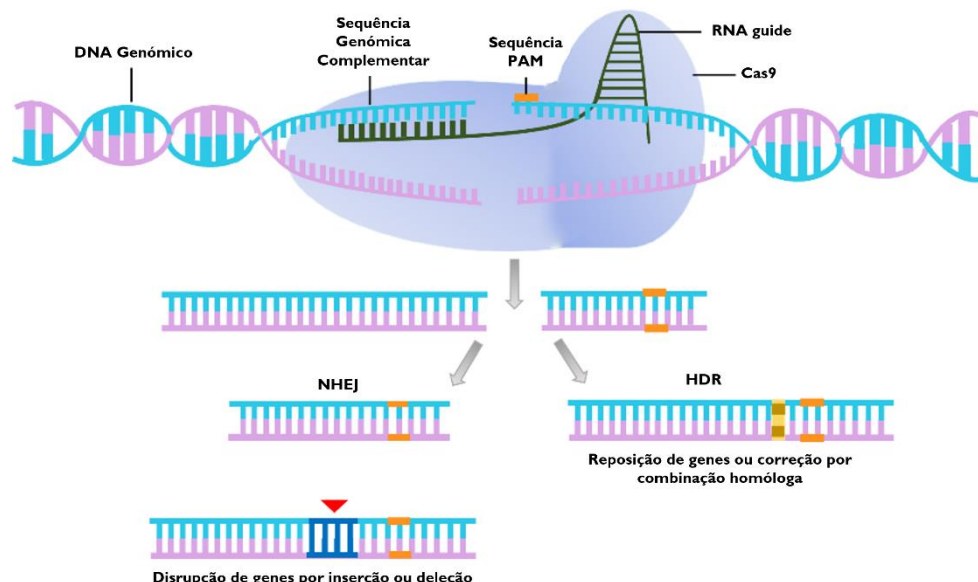


Figura 6 | Mecanismos de Reparação. Adaptado de ⁵⁴.

Especialmente para a CRISPR, coloca-se uma barreira adicional à entrega destes componentes: a entrega no interior do núcleo. Portanto, o desenvolvimento deste tipo de terapêuticas só é possível graças ao desenvolvimento de estratégias de entrega efetivas, que permitem contornar estas barreiras e transportar todos estes componentes de forma segura. Estes sistemas devem não só garantir alta especificidade para a célula-alvo, como reduzida toxicidade e *clearance* mais rápida e eficaz do complexo Cas9-gRNA, após a modificação genética pretendida, de forma a evitar efeitos indesejáveis.⁴⁷ Para entregar a Cas9 e a cadeia de gRNA nas células-alvo, podem ser preparados sistemas físicos de base viral (como adenovírus) e de base não-viral (através de nanopartículas lipídicas, polímeros ou nanopartículas inorgânicas).⁵⁵

4. Principais Barreiras a Ultrapassar

O maior obstáculo ao sucesso destas terapêuticas deve-se às várias barreiras extra e intracelulares que limitam a entrega efetiva do material genético nos compartimentos celulares a que se destinam. Ao longo deste capítulo, vamos abordar sucintamente as mais importantes, as suas principais características e como podem ser ultrapassadas.

4.1. Barreiras Extracelulares

Ao entrar na circulação sistêmica, e até chegar às células-alvo, as moléculas de RNA enfrentam uma série de barreiras físicas, químicas e biológicas, estando sujeitas a um pH extremo, a reações do sistema imunitário e à degradação por nucleases e proteases. Para evitar esta degradação, usa-se um conjunto de modificações estruturais, que podem ser

aplicadas em vários locais da molécula, e que conferem estabilidade e resistência contra as nucleases.

Moléculas de RNA livres na corrente sanguínea são, também, facilmente eliminadas pelos rins. A membrana basal dos glomérulos renais apresenta poros com diâmetro entre 6 e 10 nm. Qualquer molécula de RNA livre de conjugados consegue, facilmente, penetrar nesse mesmo poro e entrar na circulação renal.⁵⁶ Assim, é necessário que o *design* dos veículos de entrega seja feito de modo a evitar uma elevada *clearance* renal e aumentar o seu tempo de semi-vida. Para isso, são utilizadas nanopartículas lipídicas ou polímeros que revestem o material genético e impedem não só a eliminação pelos rins, mas também reduzem a imunogenicidade associada e a degradação por nucleases.⁵⁷

4.2. Especificidade para Tecidos e Células-Alvo

Aliada a todos estes fatores, a entrega de RNA deve, também, ser específica para tecidos e células-alvo, diminuindo ao máximo a biodistribuição para locais fora do interesse terapêutico e, conseqüentemente, os efeitos *off-target*. Para isso, as moléculas de RNA e respetivos sistemas de entrega podem ser covalentemente conjugados com ligandos, específicos e seletivos para determinados recetores expressos à superfície das células e dos tecidos. Existem várias possibilidades a ser usadas como ligandos, desde aptâmeros a anticorpos, lípidos e peptídeos.⁵⁸

Atualmente, existe ainda alguma dificuldade em entregar RNA na grande maioria dos órgãos, uma vez que o transporte através da barreira endotelial é ineficiente para partículas de grande dimensão (como as LNP comuns, ~100 nm). Contudo, em alguns tecidos (p. ex. fígado e alguns tumores sólidos), existem fenestrações entre as células endoteliais, que os tornam mais permeáveis ao transporte destas partículas.⁵⁹ No fígado, a descontinuidade do endotélio permite o acesso aos hepatócitos, de partículas com diâmetros de 100 a 200 nm.⁶⁰

4.3. Sistema Reticuloendotelial

Também as células do Sistema Reticuloendotelial (SRE) desempenham um papel muito importante nas defesas do nosso organismo, protegendo-o de patógenos. A sua atividade fagocitária permite-lhes capturar uma larga variedade de materiais, onde se incluem, por exemplo, as LNP. No fígado, tanto as células de Kupffer, como os recetores *scavenger* dos sinusóides hepáticos são responsáveis pela *clearance* de componentes intra e extracelulares, através de processos de fagocitose e endocitose mediada por clatrina.⁶¹ A opsonização das nanopartículas torna-as, também, muito mais acessíveis e suscetíveis a fagócitos. Para isso, o revestimento das LNP com polímeros hidrofílicos e não iónicos, como

o polietilenoglicol (PEG), é muito importante para que se consiga evitar o *uptake* por parte destas células.⁶²

4.4. Barreira Hematoencefálica

Devido ao seu tamanho e carga, as moléculas de RNA não são capazes de atravessar livremente a barreira hematoencefálica (BHE). Esta é constituída por células endoteliais fortemente ligadas entre si, sustentadas por pericitos e astrócitos.⁶³ Grande parte das moléculas é incapaz de penetrar a BHE devido à existência de *tight junctions* que, juntamente com a membrana basal, lhe conferem uma baixa permeabilidade.⁶⁴ Isto constitui um problema adicional no que toca à entrega de terapêuticas que sejam direcionadas ao Sistema Nervoso Central (SNC). A introdução sistémica por via subcutânea ou intramuscular mostra-se, então, um meio inadequado. Após várias tentativas de desenvolvimento de entrega efetiva no SNC, o Spinraza[®] (nusinersen), indicado no tratamento da Atrofia Muscular Espinhal, foi o primeiro ASO aprovado pela FDA.⁶⁵ Mostrou-se que a administração através de injeções intracerebrovasculares em murganhos e, posteriormente, intratecais em humanos possibilita uma distribuição eficaz de ASO ao longo dos tecidos do SNC e da medula espinhal.⁶⁶ No entanto, são métodos cirúrgicos bastante invasivos e que acarretam elevados riscos de complicações associadas. Por isso mesmo, é necessário investir no desenvolvimento de novas estratégias de administração sistémica, que permitam uma entrega segura e eficaz a nível do SNC.⁶⁷

4.5. Internalização Celular e Libertação do Endossoma

Atravessar a membrana plasmática e alcançar os compartimentos intracelulares adequados sempre se mostraram como barreiras importantes para terapêuticas com base em ácidos nucleicos.⁶⁸ Sabemos que moléculas de tamanho elevado e carga significativa dependem de mecanismos de transporte ativo, para conseguir atravessar eficientemente a bicamada fosfolipídica. Estes mecanismos são diferentes consoante o tipo de células com que trabalhamos, pois diferem na sua morfologia, diferenciação e química de superfície. Na grande maioria das células, que não fazem parte do sistema imunitário, os mecanismos mais prevalentes prendem-se com a endocitose mediada por clatrina e caveolina, enquanto células como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas seguem mecanismos fagocitários.⁶⁹

A endocitose mediada por clatrina é muito utilizada pelas células eucarióticas em alguns processos biológicos importantes, como a internalização de LDL. Ocorre através de poços revestidos com clatrina, que ocupam cerca de 2% da superfície da célula.⁵⁷ A endocitose mediada por caveolina está envolvida em processos de internalização de iões

como cálcio e ferro, bem como de alguns vírus, e os seus poços revestem cerca de 10-20% da superfície celular.⁷⁰

Moléculas estranhas, como as nanopartículas usadas como veículos de entrega, são internalizadas pelas células através destes processos endocíticos, estando sujeitas a mecanismos endolisossomais. A acidez do endossoma, face ao citoplasma, pode facilmente levar à degradação destas nanopartículas e do material que carregam e, por isso, devem ser capazes de abandonar rapidamente o interior do endossoma.⁷¹ Alguns estudos demonstram que cerca de 70% dos siRNA que conseguiram entrar na célula foram excretados em menos de 24h, e que apenas 1-2% foram capazes de escapar do interior do endossoma e exercer atividade em meio citoplasmático. Isto sugere-nos que a grande maioria das partículas que é internalizada por endocitose termina degradada pelos lisossomas.⁷²

4.6. Entrada Nuclear

As terapêuticas com RNA que necessitam de entrega a nível nuclear (como a CRISPR) enfrentam uma barreira adicional: atravessar a membrana do núcleo, de forma a conseguirem exercer a sua atividade.⁷³

A membrana nuclear é constituída por duas membranas (externa e interna), ligadas entre si por complexos proteicos formando poros nucleares. Tem como principal função assegurar a proteção do genoma e o transporte de proteínas entre o núcleo e o citoplasma, de forma a conseguir controlar várias atividades celulares como a replicação e transcrição de DNA. O mecanismo de internalização nuclear ainda não está suficientemente estabelecido, mas acredita-se que esteja relacionado com o reconhecimento de sinais de localização nuclear por parte de proteínas à entrada do núcleo.⁷⁴

É, por isso, também uma barreira adicional à entrega de ácidos nucleicos exógenos, e talvez a mais difícil de ultrapassar. Como alternativa, têm sido desenvolvidos esforços para o desenvolvimento de estratégias com base em mRNA, que não necessita de entrada nuclear.

5. Entrega de RNA no Meio Intracelular

Como vimos nos capítulos anteriores, existem inúmeras barreiras que necessitam de ser vencidas, de forma a conseguir entregar RNA de forma eficiente e segura no interior das células. Para isso, têm sido estudadas e desenvolvidas várias estratégias, que incluem desde modificações estruturais e químicas das moléculas de RNA, ao desenvolvimento de métodos e materiais específicos para entrega. Ao longo deste capítulo, vamos fazer uma revisão geral sobre o panorama atual destes sistemas.

5.1. Modificações Químicas e Estruturais

Uma das estratégias muito utilizadas para alcançar maior estabilidade e resistência contra as nucleases é através da modificação estrutural da molécula de RNA. Estas alterações incluem modificações ao nível da posição 2' do anel da ribose, ao nível da ligação fosfodiéster entre riboses, ou até mesmo ao nível da conformação da molécula (Fig. 7).

A substituição do átomo de oxigénio da ligação dupla (ligação fosfodiéster) por um átomo de enxofre (ligação fosforotioato) resulta num aumento da estabilidade contra a degradação enzimática.⁵⁷ A principal desvantagem prende-se com o facto de as moléculas que incluam esta modificação terem uma maior tendência para ligação às proteínas plasmáticas. À partida, podia ser considerado como uma vantagem para a entrada em meio celular e para retardar a *clearance* renal, no entanto é um fator muito associado à ocorrência de efeitos *off-target* e a toxicidade.⁷⁵

Outra estratégia bastante frequente passa pela reposição do grupo hidroxilo da posição 2'. Habitualmente, esse grupo é substituído por grupos 2'-O-Me (2'-oxi-metilo), 2'-MOE (2'-oxi-metoxietilo), ou 2'-F (2'-fluoro). Estas modificações promovem um aumento na ligação ao RNA-alvo e uma maior estabilidade dos ácidos nucleicos face às nucleases do soro.⁷⁶ Contudo, estas modificações impedem a atividade da RNase H. Nos casos em que é necessária a ação da RNase H, são usados nucleótidos espaçadores (*gapmers*) na parte mais central da molécula, capazes de receber a atividade desta enzima, em que apenas nas extremidades a posição 2' se encontra modificada.⁷⁷

Também a formação de uma ligação entre o átomo de oxigénio da posição 2' e o carbono da posição 4' estabelece uma modificação química importante, que designamos por *Locked Nucleic Acids* (LNA) por conterem uma conformação “bloqueada”, e que contribui para a resistência contra as nucleases e para o aumento da afinidade.⁷⁸ ASO's modificados com LNA apresentaram alta estabilidade no soro, sem colocar em causa a ativação da RNase H. Layla *et al.* demonstraram que, na terapêutica antibacteriana com ASO's, a utilização de

LNA como *gapmers* tornou mais eficiente a inibição da tradução do mRNA-alvo da *Escherichia coli*.⁷⁹

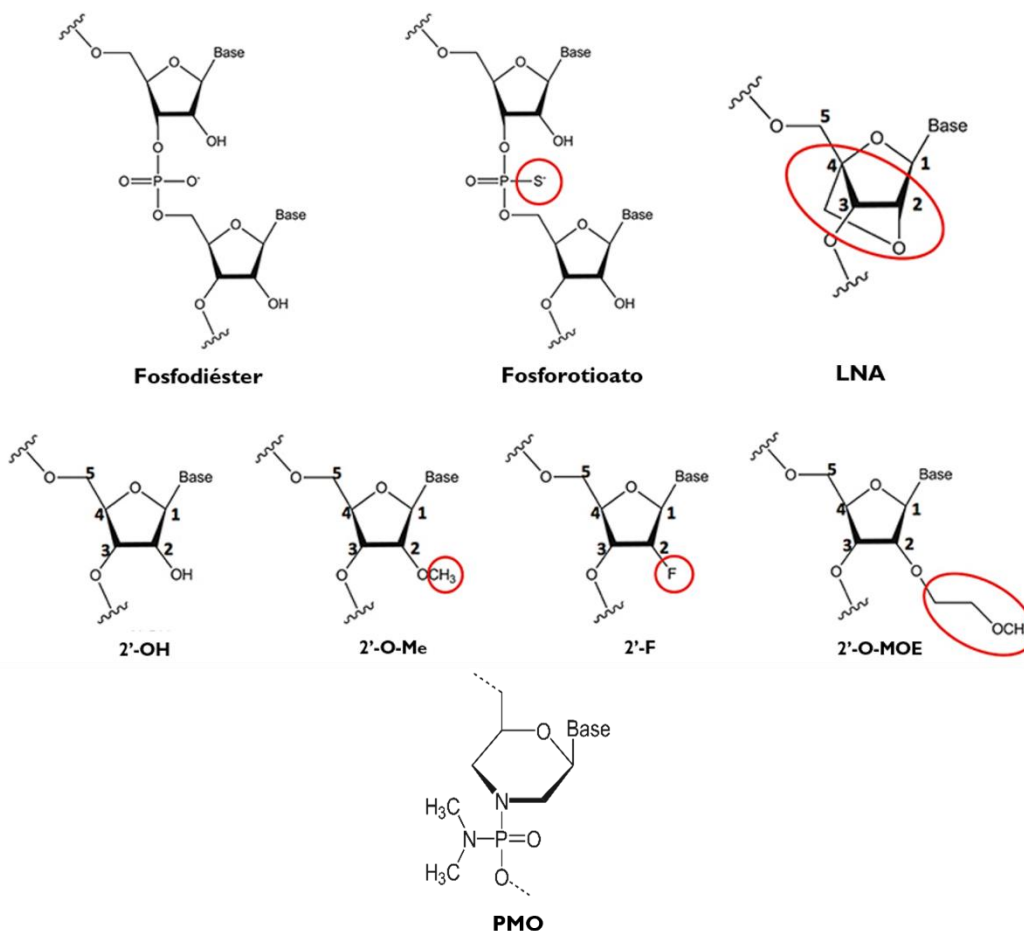


Figura 7 | Modificações Químicas e Estruturais. Adaptado de⁸⁰.

A substituição das ligações fosfato por ligações neutras (fosforodiamidato), e a substituição do anel da ribose por um anel morfolino também é uma estratégia muito utilizada e, inclusive, com aprovação para uso clínico. São designados Oligômeros Morfolino Fosforodiamidato (PMO – do inglês *Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers*). Demonstram semelhante afinidade na ligação ao RNA-alvo e menor ligação às proteínas plasmáticas devido à carga neutra que apresentam, o que os torna muito estáveis e seguros *in vivo*.⁸¹ Até ao momento, existem 3 fármacos aprovados que utilizam PMO como modificação estrutural – eteplirsen, golodirsen, viltolarsen (Tabela 2).

5.2. Vetores Virais

Os vetores de base viral podem ser bastante eficientes na entrega de RNA, sendo utilizados quer em terapêuticas de edição génica, no desenvolvimento de vacinas ou na terapia do cancro.⁸² Entre os vírus mais utilizados estão os adenovírus, os lentivírus e os vírus adeno-associados.⁸³ No geral, as principais vantagens prendem-se maioritariamente

com a boa capacidade de transfeção, com a elevada seletividade para os tecidos, boa eficiência na entrega, com a facilidade na replicação e com a possibilidade de se conseguir quer uma expressão transitória, quer prolongada, consoante o tipo de vírus que usemos. No entanto, existem uma série de desvantagens que podem servir como um impedimento na utilização clínica de vetores virais.⁸⁴ Destaca-se a dificuldade na produção em larga escala, a limitada capacidade de armazenamento, o risco de imunogenicidade associado e a introdução no genoma do hospedeiro, que pode desencadear com elevada frequência efeitos *off-target* e um elevado número de respostas imunológicas indesejáveis.⁴³

Por estes motivos, tem havido necessidade de desenvolver outras estratégias que consigam contornar estas questões, e que ofereçam uma entrega igualmente efetiva e mais segura. Para isso, têm sido desenvolvidas estratégias de base não-viral, utilizando nanopartículas lipídicas (LNP) ou poliméricas.

5.3. Nanopartículas Lipídicas

Atualmente, são uma das estratégias de entrega mais avançadas e com mais utilização na prática clínica. Como as moléculas de RNA são muito suscetíveis à degradação por nucleases, a utilização de nanopartículas lipídicas (LNP) contribui para a manutenção da integridade e atividade destas moléculas no interior das células.⁸⁵

5.3.1. Lipossomas

São partículas que contêm um núcleo aquoso e podem ser compostas por lípidos catiónicos que interagem por via eletrostática com as moléculas de RNA, tipicamente aniónicas, formando complexos designados “lipoplexos”, com um tamanho $\cong 100$ nm.⁸⁶ Para além de lípidos catiónicos, as LNP são também compostas por (Fig. 8): um fosfolípido auxiliar (p. ex. DOPE – (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina) – ou DSPC – (1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina)), que assegura uma maior encapsulação do RNA no interior da vesícula lipídica e que contribui para a integridade estrutural e fusogenicidade; moléculas de colesterol, úteis para a estabilidade da partícula em circulação; e um lípido PEGilado (tipicamente um domínio hidrofílico à base de polietilenoglicol (PEG) conjugado com uma cadeia lipídica hidrofóbica) que evita o reconhecimento pelo sistema imunitário e, consequentemente, aumenta o tempo de semi-vida *in vivo*.^{83,84} A utilização de PEG, no entanto, tem prós e contras, uma vez que está relacionada com uma maior dificuldade na libertação da partícula do interior do endossoma.⁷¹ A carga positiva que os lípidos catiónicos apresentam é também útil para se associarem eficientemente com a superfície da célula, carregada negativamente. Apesar de demonstrarem boa eficácia na transfeção *in vitro*, a sua

utilização *in vivo* torna-se muito limitada, uma vez que apresentam elevados sinais de toxicidade e baixa eficiência na transfeção.⁶⁷

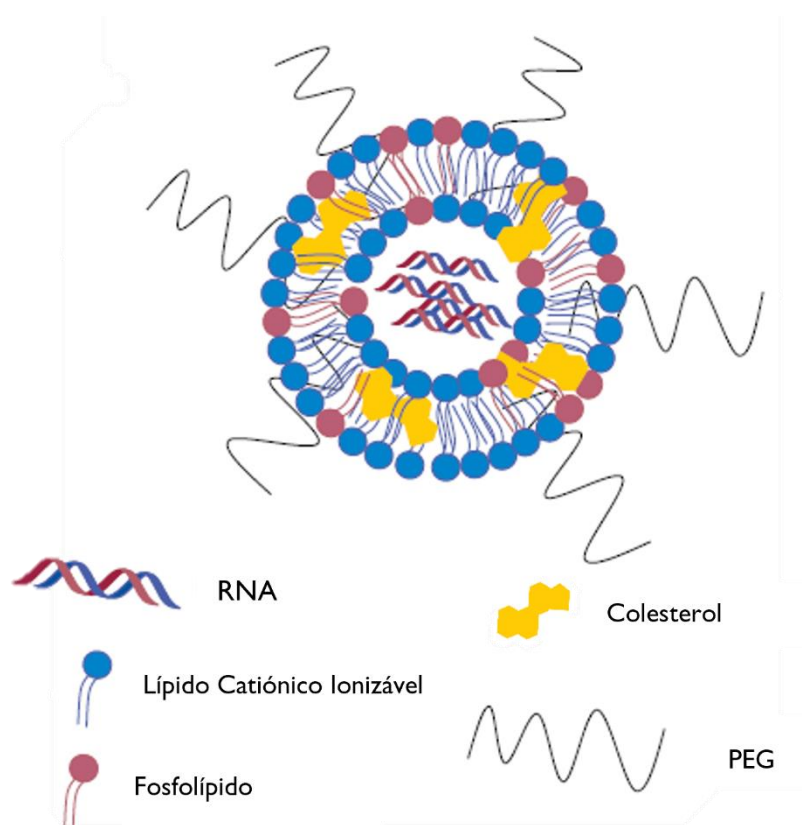


Figura 8 | Estrutura típica de uma nanopartícula lipídica para entrega de RNA. Adaptado de ⁸⁹.

Para solucionar este problema, têm sido desenvolvidos lípidos catiónicos ionizáveis (p. ex. DODAP - 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano), que apresentam baixos valores de pKa (entre 6.6 a 7). Isto permite-lhes obter uma carga neutra em pH fisiológico (o que diminui a toxicidade) e ficarem positivamente carregados no interior do endossoma, possibilitando a libertação do seu interior e destabilização das LNP para libertação do material genético.⁸⁹ Novos desenvolvimentos com base no DODAP, relacionados principalmente com maior diminuição de pKa, levaram ao aparecimento de uma série de novos lípidos catiónicos ionizáveis (Tabela I).⁹⁰ Como exemplo prático, temos o patisiran (Onpattro[®]), o primeiro siRNA aprovado para uso clínico, quimicamente modificado e indicado para o tratamento da amiloidose hereditária mediada por transtirretina (TTR). Tira partido de LNP à base de novos lípidos catiónicos ionizáveis, como o DLin-MC3-DMA (dilinoilmetil-4-dimetilaminobutirato), que conjugados com DSPC, colesterol e PEG-2000, entregam o siRNA nos hepatócitos, reduzindo eficazmente os níveis de TTR mutante e com baixos sinais de toxicidade.⁹¹ Também as vacinas de mRNA, desenvolvidas pela Pfizer e pela Moderna e aprovadas para uso emergencial contra a COVID-19, são um exemplo da utilização de LNP como sistemas de entrega eficazes.

Tabela 1 – Exemplos de Lípidos Catiônicos Ionizáveis

EXEMPLOS DE LÍPIDOS CATIÓNICOS IONIZÁVEIS		
ESTRUTURA	ABREVIATURA	IUPAC
	DODAP	1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano
	DLin-DMA	1,2-dilinoiléioxi-n,n-dimetil-3-aminopropano
	DLin-KC2-DMA	2,2-dilinoiléil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano
	DLin-MC3-DMA	Dilinoiléilmetil-4-dimetilaminobutirato

5.3.2. SLN e NLC

Outra abordagem que tem ganho muito interesse por parte da comunidade científica prende-se com o desenvolvimento de LNP com uma matriz sólida. Podem ser classificadas como nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) e veículos lipídicos nanoestruturados (NLC).⁹²

As SLN caracterizam-se por apresentarem um núcleo lipídico sólido, rodeado externamente por uma camada de surfactantes em dispersão aquosa. As principais vantagens relacionam-se com boa estabilidade devido à matriz sólida, baixa toxicidade, capacidade de libertação prolongada e com métodos de fabrico relativamente seguros, rentáveis e reprodutíveis.⁹³ No entanto, o facto de serem dotadas de uma matriz sólida extremamente lipofílica dificulta a encapsulação de ácidos nucleicos, moléculas tipicamente aniónicas e hidrofílicas.⁸² A utilização de lípidos catiónicos na composição da partícula pode ser útil para a conjugação com ácidos nucleicos, permitindo a co-administração de DNA/RNA e de um fármaco lipofílico. Em 2012, Yong *et al.* desenvolveram uma SLN catiónica capaz de co-administrar *in vivo* paclitaxel e moléculas de siRNA contra o gene MCLI (associado a doenças como Leucemia Mieloide), em murganhos, demonstrando elevada atividade antitumoral nos ensaios clínicos (Fig. 9).⁹⁴

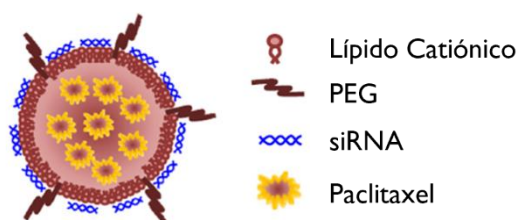


Figura 9 | Nanopartícula lipídica sólida, contendo siRNA e Paclitaxel. Adaptado de ⁹⁴.

Quanto aos NLC (Fig. 10), baseiam-se em forma modificadas de SLN, em que a fase lipídica consiste, simultaneamente, em lípidos no estado líquido e sólido. A principal vantagem, face às SLN, está relacionada com uma maior capacidade de armazenamento.⁹⁵ Nos últimos anos, têm sido associadas a um bom potencial para utilização no desenvolvimento de novas terapias génicas contra o cancro. Em 2013, Tarantula *et al.* estudaram a formulação de NLC contendo dois siRNA, juntamente com paclitaxel e doxorubicina, para utilização por inalação na terapia do cancro do pulmão, mostrando alta eficiência na entrega pulmonar destes componentes e boa atividade antitumoral.⁹⁶

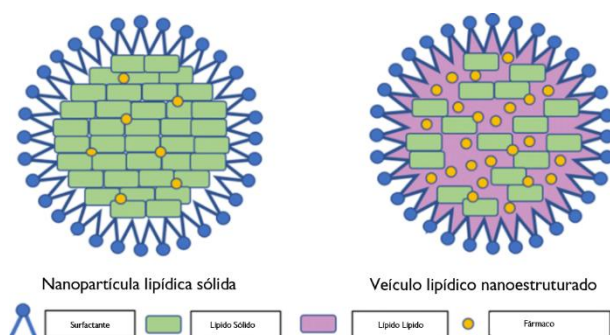


Figura 10 | Estrutura de Nanopartículas Lipídicas Sólidas versus Veículo Lipídico Nanoestruturado. Adaptado de ⁹⁷.

5.4. Polímeros

Nanopartículas construídas através da utilização de polímeros, têm sido outro método promissor de entrega de RNA, pelas vantagens que apresentam: são seguras do ponto de vista biológico, por serem pouco imunogénicas e não causarem mutagénese; são partículas quimicamente muito versáteis; a sua produção é rentável, pois a sua síntese é fácil e de baixo custo.⁹⁸

Nos primeiros estudos, foram investigados polímeros naturais (como o quitosano e o alginato) para utilização como vetores de entrega, mas apresentaram baixa capacidade de transfeção. Na tentativa de aumentar a eficiência na entrega, foram desenvolvidos novos polímeros sintéticos.⁶⁷ Tal como nas LNP, a utilização de polímeros catiónicos permite a complexação eletrostática com moléculas de RNA, formando “poliplexos” (Fig. 11).⁹⁹



Figura 11 | Formação de Poliplexos. Adaptado de ⁸⁸.

Um dos polímeros mais estudados é a polietilenimina (PEI), um polímero extremamente catiónico, que é capaz de sofrer protonação devido à presença dos grupos amino (NH_2). Esta capacidade de protonação é bastante útil na libertação do endossoma, por ser capaz de criar o “Efeito Esponja de Protões” e induzir a entrada de iões H^+ , Cl^- e água, levando ao aumento da pressão osmótica e rutura da membrana dos endossomas.¹⁰⁰ No entanto, sistemas baseados em PEI mostraram vastos sinais de citotoxicidade, um pouco relacionada com a sua elevada carga catiónica.¹⁰¹

De forma a reduzir a toxicidade, foi desenvolvida uma “nova geração” de polímeros catiónicos não-tóxicos (Fig. 12), que mostraram melhores sinais na transfeção do material genético, sem intervir na sua integridade, e de que são exemplos o poli(β -aminoéster) (PBAE), o poli(2-(dimetilamino)etil metacrilato) (PDMAEMA) e o dendrímero poliamidoamina (PAMAM). Tanto no PBAE como no PDMAEMA, as aminas terciárias nas extremidades são úteis para serem protonadas no pH ácido dos endossomas, levando também à disrupção da membrana e libertação do material genético no interior das células.^{102,37}

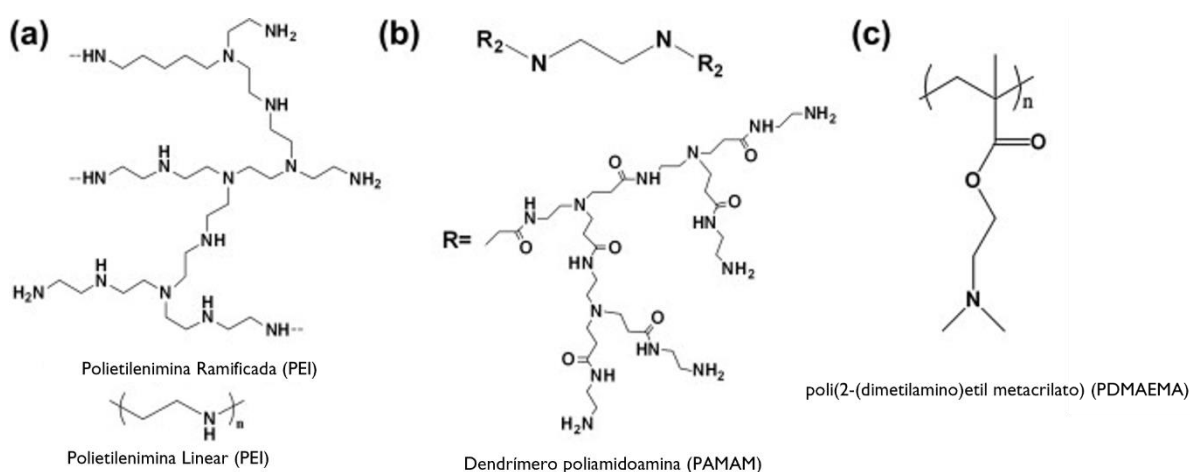


Figura 12 | Estruturas Químicas de Polímeros Catiónicos. Adaptado de ¹⁰³.

O revestimento destes polímeros com PEG também se mostra muito relevante na proteção da estabilidade da partícula, uma vez que são capazes de aumentar a transfeção celular e o tempo de semi-vida das nanopartículas.

Outro polímero muito estudado e que tem suscitado muito interesse na terapêutica com siRNA é o PLGA (poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)). É um co-polímero não-tóxico biocompatível e biodegradável, não imunogénico e com capacidade de induzir um bom perfil de libertação prolongada.^{13, 98} Em 2018, Yeongseon *et al.* desenvolveram partículas de PLGA conjugada com moléculas de ácido hialurónico como ligando do recetor CD44, onde incorporaram paclitaxel e siRNA contra o gene da PTK2 (proteína tirosina-cinase 2), para o tratamento do cancro ovárico. Após administração *in vivo* em murganhos, foi possível

verificar a inibição do crescimento tumoral, sem efeitos adversos significativos, mostrando que a utilização de nanopartículas com base em PLGA é bastante atrativa para a entrega de siRNA *in vivo*.¹⁰⁵

5.5. Nanopartículas Híbridas Lípido-Polímero

De maneira a conseguir conjugar as principais valências dos dois sistemas anteriores, foram desenvolvidas nanopartículas híbridas lípido-polímero (LPHN), que podemos designar como “lipopolíplexos” (Fig. 13). São partículas com núcleo polimérico e superfície à base de lípidos, que pode apresentar-se na forma de monocamada ou bicamada, onde se podem conjugar ligandos à superfície que direcionem a partícula para as células-alvo, e moléculas de PEG para garantir a estabilidade.¹⁰⁶

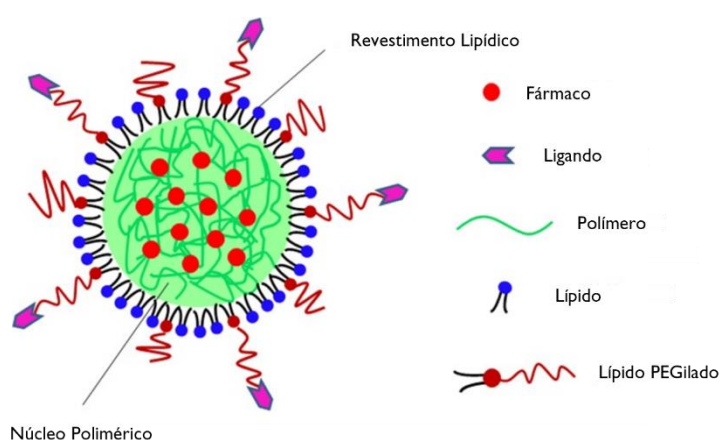


Figura 13 | Estrutura de uma Nanopartícula Híbrida Lípido-Polímero. Adaptado de ¹⁰⁷.

Stefano *et al.* desenvolveram uma vacina de mRNA antitumoral, com base em LPHN, que consistia num núcleo polimérico de PBAE encapsulado no interior de uma bicamada lipídica composta por EDOPC/DOPE/DSPE-PEG-2000 (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina/1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidil-etanolamina/1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfo-etanolamina-N-[amino(polietileno glicol)-2000]). Este novo sistema mostrou boa eficácia na estimulação da expressão do Interferão- β e da Interleucina-12, promovendo imunidade anti-tumoral.¹⁰⁸

Apesar de ainda serem necessários mais estudos e ensaios clínicos, quer no campo dos polímeros ou das LPHN, para assegurar eficácia e segurança *in vivo*, ambas se mostram como estratégias muito promissoras para o desenvolvimento de terapêuticas com RNA.

5.6. Nanopartículas Inorgânicas

Os mais recentes estudos mostram o desenvolvimento de novas abordagens de entrega. Neste conjunto incluem-se nanopartículas inorgânicas (como nanotubos de carbono, ou nanopartículas à base de sílica, óxido de ferro ou ouro), devido ao seu baixo

custo e facilidade de síntese. No entanto, são não-degradáveis e potencialmente tóxicas.^{19, 102} Ainda assim, dentro destas, destacam-se as nanopartículas à base de ouro (GNP), por serem não-tóxicas e pela facilidade na modulação do seu tamanho e forma.⁹⁸ Em 2016, Yifeng *et al.* desenvolveram um complexo GNP-siRNA para inibição do gene NGF (fator de crescimento nervoso) no tratamento do cancro pancreático. Este sistema mostrou-se eficiente na entrega *in vivo* em murganhos, com boa eficácia na inibição do gene NGF e sem evidência de toxicidade significativa.¹¹⁰

Embora os resultados sejam animadores, devido ao potencial tóxico destes sistemas são necessários estudos mais aprofundados, de forma a garantir a eficácia e segurança *in vivo*.

5.7. Conjugação com Ligandos

Para se conseguir uma eficiente internalização nos tecidos e células-alvo, as moléculas de RNA devem ser direcionadas para esses mesmos locais. Habitualmente, esse encaminhamento é feito pela conjugação de ligandos à superfície da partícula, que serão específicos para determinados recetores e proteínas expressos à superfície das células e tecidos.⁸⁶ Exemplos de recetores com elevados níveis de expressão incluem integrinas, recetores acoplados à proteína-G, recetores tirosina-cinase, recetores *Toll-like* e o recetor da asialoglicoproteína (ASGR). Esta entrega direcionada permite aumentar a biodisponibilidade do material genético nas células-alvo e, conseqüentemente, diminuir a quantidade de efeitos *off-target* e toxicidade.

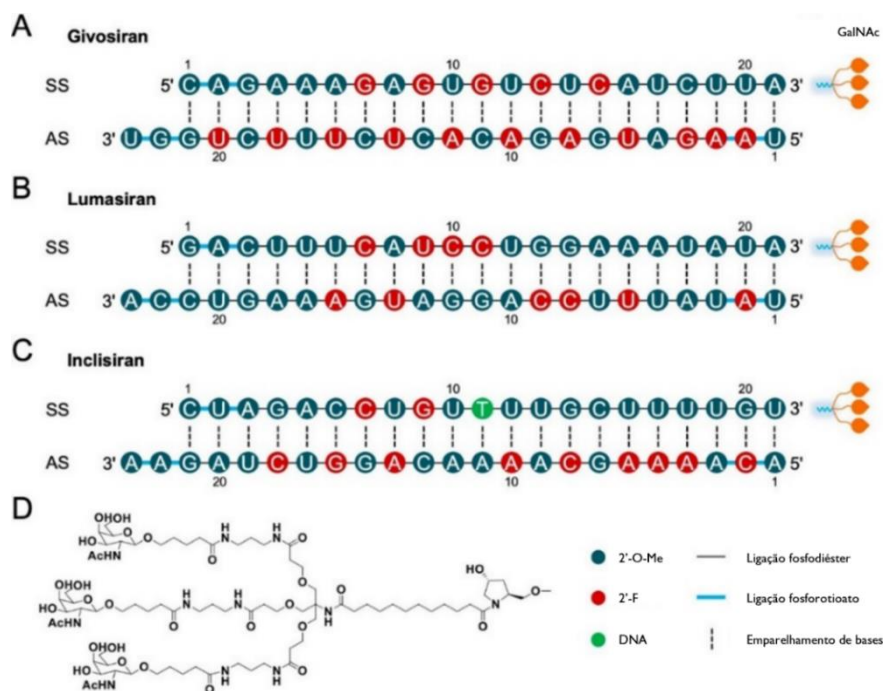


Figura 14 | Sequências nucleotídicas e modificações estruturais de siRNA's aprovados com ligando GalNAc. Adaptado de ⁶⁰. A – Givosiran; B – Lumasiran; C – Inclisiran; D – Estrutura química da N-acetilgalactosamina (GalNAc). AS – cadeia *antisense*; SS – cadeia *sense*.

Existem várias possibilidades a ser usadas como ligandos, desde aptâmeros a anticorpos, lípidos e peptídeos. Uma das estratégias clinicamente mais avançadas foi desenvolvida pela Alnylam® Pharmaceuticals, que conjuga N-acetilgalactosamina (GalNac) na extremidade 3' de moléculas de siRNAs, tornando-as capazes de se ligarem com alta afinidade aos recetores da ASGR expressos no fígado, permitindo uma entrega segura e eficaz.^{104, 105} De momento, existem três fármacos aprovados (Fig. 14) e que utilizam este conjugado, todos eles desenvolvidos por esta empresa: Givosiran, para o tratamento da Porfíria Hepática Aguda; Lumasiran, para o tratamento da Hiperoxalúria primária tipo I; e Inclisiran, para o tratamento da Hipercolesterolemia.⁶⁰

6. Terapêuticas de RNA com Aprovação para Uso Clínico

O desenvolvimento de todas estas estratégias, juntamente com os bons resultados em ensaios clínicos, permitiu a aprovação para uso clínico de várias moléculas de RNA, por parte das entidades regulamentares. Na Tabela 2, estão descritas as terapêuticas de RNA (e os seus detalhes) com autorização de introdução no mercado válida, por parte da EMA e da FDA. De realçar que, para além destas, já tinham sido aprovados outros fármacos que tiveram de ser retirados do mercado, maioritariamente devido à ocorrência de efeitos adversos. Entre estas, destacam-se o pegaptanib (aptâmero), mipomersen (ASO) e o fomivirsen (ASO), que atualmente se encontram descontinuados.

Tabela 2: Terapêuticas com RNA aprovadas para uso clínico (EMA e FDA 2021).

Terapêuticas com RNA Aprovadas para Uso Clínico (EMA e FDA - 2021)									
Nome	Nome comercial	Tipo de RNA	Modificação Estrutural; Entrega	Condição	Alvo	Mecanismo de ação	Ano de aprovação	Fabricante	Ref.
Nusinersen	Spinraza®	ASO	2'-MOE, PS	Atrofia Muscular Espinhal	mRNA SMN2	Liga-se seletivamente ao mRNA do gene SMN2, intervindo no processo de <i>splicing</i> . Induz a inclusão do exão 7 no mRNA funcional, levando à formação de proteína funcional de SMN.	2016 ^a ; 2017 ^b	Biogen/Ionis	106, 107
Eteplirsen	Exondys 51®	PMO	-	Distrofia Muscular de Duchenne	Exão 51	Exclusão do exão 51 do pré-mRNA da distrofina, para produzir a proteína funcional.	2016 ^a	Sarepta	108-110
Inotersen	Tegsedi®	ASO	2'-MOE	Amiloidose Hereditária por Transtirretina	mRNA TTR	Liga-se seletivamente ao mRNA da TTR, causando a sua degradação.	2018	Ionis	111-113
Patisiran	Onpattro®	siRNA	LNP	Amiloidose Hereditária por Transtirretina	3'-UTR mRNA TTR	Degradação do mRNA da TTR, e consequente redução da proteína TTR plasmática.	2018	Alnylam	114, 116
Volanesorsen	Waylivra®	ASO	-	Síndrome Quilomicronémia Familiar	3'-UTR mRNA ApoC-III	Impedimento da tradução da proteína ApoC-III, ativando a depuração de triglicéridos.	2019 ^b	Ionis	117, 118
Givosiran	Givlaari®	siRNA	2'-O-Me, 2'-F, PS; Gal-NAC	Porfiria Hepática Aguda	mRNA ALAS1	Degradação do mRNA do ALAS1, reduzindo os níveis circulantes de ALA e PBG.	2019 ^a ; 2020 ^b	Alnylam	119-121
Golodirsen	Vyondys 53®	PMO	-	Distrofia Muscular de Duchenne	Exão 53	Exclusão do exão 53 do pré-mRNA da distrofina, para produzir a proteína funcional.	2019 ^a	Sarepta	122, 123
Viltolarsen	Viltepso®	PMO	-	Distrofia Muscular de Duchenne	Exão 53	Exclusão do exão 53 do pré-mRNA da distrofina, para produzir a proteína funcional.	2020	NS Pharma	124-126

Lumasiran	Oxlumo®	siRNA	2'-O-Me, 2'-F, PS; Gal-NAC	Hiperoxalúria primária de tipo I	mRNA do HAO I	Inibição do mRNA do HAO I, reduzindo os níveis de GO e consequentes níveis de oxalato na urina.	2020	Alnylam	127-129
Inclisiran	Leqvio®	siRNA	2'-O-Me, 2'-F, PS; Gal-NAC	Hipercolesterolemia primária	mRNA da PCSK9	Clivagem do mRNA da PCSK9, aumentando a expressão de receptores c-LDL à superfície dos hepatócitos, e consequente captação e diminuição dos valores séricos	2020 ^b	Alnylam	130, 131
BNT162b2	Comirnaty®	mRNA com nucleosídeo modificado	LNP	Infeção por SARS-CoV-2	-	Expressão da proteína Spike à membrana celular, com indução de respostas por parte de anticorpos e linfócitos B e T citotóxicos	2020 ^c	Pfizer/ BioNTech	132-135
mRNA-1273	Spikevax®	mRNA com nucleosídeo modificado	LNP	Infeção por SARS-CoV-2	-	Expressão da proteína Spike à superfície da membrana celular, com indução de respostas por parte de anticorpos e linfócitos B e T citotóxicos	2020 ^{a,c} , 2021 ^{b,c}	Moderna	136-138

Legenda: 2'-F – 2'-fluoro; 2'-O-Me – 2'-oximetil; 2'-MOE – 2'-metoxietil; ALA - ácido aminolevulínico; ALAS1 – ácido aminolevulínico sintase I; ApoC-III – apolipoproteína C-III; ASO – oligonucleotídeo antisense; c-LDL – colesterol lipoproteína de baixa densidade; Gal-NAC – N-acetilgalactosamina; LNP – nanopartículas lipídicas; mRNA – RNA mensageiro; PCSK9 – pró-proteína convertase subtilisina quexina tipo 9; PS – substituição Fosforitoato; siRNA – *short-interference* RNA; SARS-CoV-2 – Síndrome Respiratório Agudo Grave do Coronavírus 2; HAO I – hidroxiácido oxidase I; GO – glicolato oxidase; PBG – porfobilinogénio; PMO – oligómero fosforodiámidato morfolino; UTR – região não codificante; TTR – transtirretina; SMN – proteína de sobrevivência do neurónio motor[†];

^a Aprovado pela FDA; ^b Aprovado pela EMA; ^c Aprovado para uso emergencial

7. Conclusão

As terapêuticas com base em RNA têm mostrado o seu enorme potencial no tratamento de um vasto leque de doenças, que se consideravam impossíveis de tratar pela dificuldade no acesso aos potenciais alvos terapêuticos. A evolução científica e tecnológica permitiu o desenvolvimento de veículos de entrega que são capazes de ultrapassar várias barreiras e entregar especificamente nas células-alvo o material genético que carregam, de forma eficaz e segura.

Nos últimos anos, temos visto o crescimento exponencial deste tipo de terapêuticas, tanto pelo aparecimento das técnicas de edição gênica, como pela quantidade de novos fármacos que têm vindo a ser aprovados. A CRISPR tem-se mostrado muito promissora e revolucionária no mundo da terapia de genes, por ser capaz de editar genes e curar doenças. Muitos investigadores centram-se agora no aprimoramento desta técnica e dos seus sistemas de entrega. Ainda que sejam necessários alguns anos até que possa ser aprovada e transposta para uso clínico, há o grande desejo, por parte da comunidade científica, de que esta se possa tornar rapidamente uma terapêutica segura *in vivo* e com capacidade de mudar vidas.

O estudo das modificações químicas e dos vários materiais para entrega intracelular foram, também, uma peça-chave para o desenvolvimento de novas abordagens eficazes. Podemos verificar que grande parte dos fármacos atualmente aprovados tiram partido destas abordagens. A aprovação do Nusinersen (ASO quimicamente modificado) e do Patisiran (siRNA-LNP), em 2016 e 2018 respetivamente, despoletaram uma série de estudos que aprofundaram estas modificações e que levaram ao atual número crescente de terapêuticas aprovadas e em ensaios clínicos. Também o desenvolvimento de ligandos específicos fez com que fosse possível direcionar o material genético para locais de ação pretendidos, reduzindo toxicidade e efeitos *off-target*. Exemplo disso é a Gal-NAc, que permitiu o desenvolvimento e aprovação de siRNA's específicos para os hepatócitos, sem sinais de toxicidade.

Efetivamente, grande parte das terapêuticas aprovadas são direcionadas para o fígado. Um dos principais desafios para o futuro prende-se, exatamente, com dirigir o material genético para locais extra-hepáticos, de forma a conseguir alcançar outros alvos e outras doenças. Por isso, será necessário o desenvolvimento de novos ligandos que permitam o acesso a outros órgãos, sem serem necessárias elevadas doses.¹⁴⁶

A par com isto, serão sempre necessários mais estudos para desenvolver estratégias de entrega cada vez mais eficazes e seguras. O estudo de nanopartículas poliméricas ou

inorgânicas tem mostrado também um enorme potencial, pelo que é necessário investir continuamente para que possam ser transpostas para utilização em humanos.

Em suma, o mundo da terapia de genes e das estratégias de entrega está apenas no início de uma longa vida, e prevê-se uma (ainda) maior expansão nos próximos anos, particularmente no que toca à utilização de RNA no tratamento de doenças crónicas e cancerígenas.

Referências Bibliográficas

1. YU, Ai Ming; CHOI, Young Hee; TU, Mei Juan - RNA drugs and RNA targets for small molecules: Principles, progress, and challenges. **Pharmacological Reviews**. ISSN 15210081. 72:4 (2020) 862–898. doi: 10.1124/pr.120.019554.
2. JULIANO, Rudolph L. - The delivery of therapeutic oligonucleotides. **Nucleic Acids Research**. ISSN 13624962. 44:14 (2016) 6518–6548. doi: 10.1093/nar/gkw236.
3. SAHIN, Ugur; KARIKÓ, Katalin; TÜRECI, Özlem - mRNA-based therapeutics-developing a new class of drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**. ISSN 14741784. 13:10 (2014) 759–780. doi: 10.1038/nrd4278.
4. ELKON, Ran; UGALDE, Alejandro P.; AGAMI, Reuven - Alternative cleavage and polyadenylation: Extent, regulation and function. **Nature Reviews Genetics**. ISSN 14710056. 14:7 (2013) 496–506. doi: 10.1038/nrg3482.
5. BAJAN, Sarah; HUTVAGNER, Gyorgy - RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs. **Cells**. ISSN 20734409. 9:1 (2020) 1–27. doi: 10.3390/cells9010137.
6. DOWDY, Steven F. - Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics. **Nature Biotechnology**. ISSN 15461696. 35:3 (2017) 222–229. doi: 10.1038/nbt.3802.
7. CROOKE, Stanley T.; GEARY, Richard S. - Clinical pharmacological properties of mipomersen (Kynamro), a second generation antisense inhibitor of apolipoprotein B. **British Journal of Clinical Pharmacology**. ISSN 03065251. 76:2 (2013) 269–276. doi: 10.1111/j.1365-2125.2012.04469.x.
8. CROOKE, Stanley T. *et al.* - RNA-Targeted Therapeutics. **Cell Metabolism**. ISSN 19327420. 27:4 (2018) 714–739. doi: 10.1016/j.cmet.2018.03.004.
9. ALZHRANI, Rami *et al.* - Improving the therapeutic efficiency of noncoding RNAs in cancers using targeted drug delivery systems. **Drug Discovery Today**. ISSN 18785832. 25:4 (2020) 718–730. doi: 10.1016/j.drudis.2019.11.006.
10. ZHANG, Xiaopei *et al.* - Mechanisms and functions of long non-coding RNAs at multiple regulatory levels. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 14220067. 20:22 (2019). doi: 10.3390/ijms20225573.
11. BEERMANN, Julia *et al.* - Non-coding rnas in development and disease: Background, mechanisms, and therapeutic approaches. **Physiological Reviews**. ISSN 15221210.

- 96:4 (2016) 1297–1325. doi: 10.1152/physrev.00041.2015.
12. CHATTERJEE, Manjima; VISWANATHAN, Pragasam - Long noncoding RNAs in the regulation of p53-mediated apoptosis in human cancers. **Cell Biology International**. ISSN 10958355. January (2021). doi: 10.1002/cbin.11597.
 13. TODEN, Shusuke; ZUMWALT, Timothy J.; GOEL, Ajay - Non-coding RNAs and potential therapeutic targeting in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**. ISSN 18792561. 1875:1 (2021) 188491. doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188491.
 14. CHARBE, Nitin Bharat *et al.* - Small interfering RNA for cancer treatment: overcoming hurdles in delivery. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. ISSN 22113843. 10:11 (2020) 2075–2109. doi: 10.1016/j.apsb.2020.10.005.
 15. LISOWIEC-WĄCHNICKA, Jolanta; BARTYŚ, Natalia; PASTERNAK, Anna - A systematic study on the influence of thermodynamic asymmetry of 5'-ends of siRNA duplexes in relation to their silencing potency. **Scientific Reports**. ISSN 20452322. 9:1 (2019) 1–12. doi: 10.1038/s41598-018-36620-9.
 16. MATRANGA, Christian *et al.* - Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. **Cell**. ISSN 00928674. 123:4 (2005) 607–620. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.044.
 17. LENNOX, Kim A.; BEHLKE, Mark A. - Cellular localization of long non-coding RNAs affects silencing by RNAi more than by antisense oligonucleotides. **Nucleic Acids Research**. ISSN 13624962. 44:2 (2016) 863–877. doi: 10.1093/nar/gkv1206.
 18. HU, Bo *et al.* - Clinical advances of siRNA therapeutics. **Journal of Gene Medicine**. ISSN 15212254. 21:7 (2019) 1–14. doi: 10.1002/jgm.3097.
 19. BAYRAKTAR, Recep; ROOSBROECK, Katrien VAN - miR-155 in cancer drug resistance and as target for miRNA-based therapeutics. **Cancer and Metastasis Reviews**. ISSN 15737233. 37:1 (2018) 33–44. doi: 10.1007/s10555-017-9724-7.
 20. LEE, Sharon Wei Ling *et al.* - MicroRNA delivery through nanoparticles. **Journal of Controlled Release**. ISSN 18734995. 313:October (2019) 80–95. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.10.007.
 21. TAKAHASHI, Ryou U. *et al.* - Development of miRNA-based therapeutic approaches for cancer patients. **Cancer Science**. ISSN 13497006. 110:4 (2019) 1140–1147. doi: 10.1111/cas.13965.
 22. KRETH, Simone; HÜBNER, Max; HINSKE, Ludwig Christian - MicroRNAs as clinical

- biomarkers and therapeutic tools in perioperative medicine. **Anesthesia and Analgesia**. ISSN 15267598. 126:2 (2018) 670–681. doi: 10.1213/ANE.0000000000002444.
23. FRIEDMAN, Robin C. *et al.* - Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Research**. ISSN 10889051. 19:1 (2009) 92–105. doi: 10.1101/gr.082701.108.
 24. RUPAIMOOLE, Rajesha; SLACK, Frank J. - MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**. ISSN 14741784. 16:3 (2017) 203–221. doi: 10.1038/nrd.2016.246.
 25. CONDRAT, Carmen Elena *et al.* - miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. **Cells**. ISSN 20734409. 9:2 (2020) 1–32. doi: 10.3390/cells9020276.
 26. PETREK, Hannah; YU, Ai Ming - MicroRNAs in non-small cell lung cancer: Gene regulation, impact on cancer cellular processes, and therapeutic potential. **Pharmacology research & perspectives**. ISSN 20521707. 7:6 (2019) e00528. doi: 10.1002/prp2.528.
 27. GRIMM, Dirk *et al.* - Argonaute proteins are key determinants of RNAi efficacy, toxicity, and persistence in the adult mouse liver. **Journal of Clinical Investigation**. ISSN 00219738. 120:9 (2010) 3106–3119. doi: 10.1172/JCI43565.
 28. NIMJEE, Shahid M. *et al.* - Aptamers as Therapeutics. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. ISSN 15454304. 57:2017) 61–79. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010716-104558.
 29. ZHANG, Yang; LAI, Bo Shiun; JUHAS, Mario - Recent advances in aptamer discovery and applications. **Molecules**. ISSN 14203049. 24:5 (2019). doi: 10.3390/molecules24050941.
 30. ZHOU, Jiehua; ROSSI, John - Aptamers as targeted therapeutics: Current potential and challenges. **Nature Reviews Drug Discovery**. ISSN 14741784. 16:3 (2017) 181–202. doi: 10.1038/nrd.2016.199.
 31. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - Withdrawal assessment report for pegaptanib. 44:September (2011).
 32. KOWALSKI, Piotr S. *et al.* - Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. **Molecular Therapy**. ISSN 15250024. 27:4 (2019) 710–

728. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.02.012.
33. HO, William *et al.* - Next-Generation Vaccines: Nanoparticle-Mediated DNA and mRNA Delivery. **Advanced Healthcare Materials**. ISSN 21922659. 10:8 (2021) 1–17. doi: 10.1002/adhm.202001812.
 34. MARUGGI, Giulietta *et al.* - mRNA as a Transformative Technology for Vaccine Development to Control Infectious Diseases. **Molecular Therapy**. ISSN 15250024. 27:4 (2019) 757–772. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.01.020.
 35. ZHANG, Cuiling *et al.* - Advances in mRNA vaccines for infectious diseases. **Frontiers in Immunology**. ISSN 16643224. 10:MAR (2019) 1–13. doi: 10.3389/fimmu.2019.00594.
 36. XU, Shuqin *et al.* - **Mrna vaccine era—mechanisms, drug platform and clinical prospection**. ISBN 1886183031.
 37. GEALL, Andrew J. *et al.* - Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. ISSN 00278424. 109:36 (2012) 14604–14609. doi: 10.1073/pnas.1209367109.
 38. RICHNER, Justin M. *et al.* - Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. **Cell**. ISSN 10974172. 168:6 (2017) 1114–1125.e10. doi: 10.1016/j.cell.2017.02.017.
 39. PARDI, Norbert *et al.* - mRNA vaccines—a new era in vaccinology. **Nature Reviews Drug Discovery**. ISSN 14741784. 17:4 (2018) 261–279. doi: 10.1038/nrd.2017.243.
 40. WADHWA, Abishek *et al.* - Opportunities and challenges in the delivery of mrna-based vaccines. **Pharmaceutics**. ISSN 19994923. 12:2 (2020). doi: 10.3390/pharmaceutics12020102.
 41. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - Assessment report: COVID-19 Vaccine Comirnaty. **EMA/707383/2020 Corr.1***. 31:February (2021) 1–140.
 42. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - Assessment report: COVID-19 Vaccine Moderna Common. 31:31 March (2021) 9–153.
 43. XU, Christine L. *et al.* - Viral delivery systems for crispr. **Viruses**. ISSN 19994915. 11:1 (2019) 1–12. doi: 10.3390/v11010028.
 44. PICKAR-OLIVER, Adrian; GERSBACH, Charles A. - The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. ISSN

14710080. 20:8 (2019) 490–507. doi: 10.1038/s41580-019-0131-5.
45. LIU, Chang *et al.* - Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. **Journal of Controlled Release**. ISSN 18734995. 266:816 (2017) 17–26. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.09.012.
 46. WANG, Haifeng; RUSSA, Marie LA; QI, Lei S. - CRISPR/Cas9 in Genome Editing and beyond. **Annual Review of Biochemistry**. ISSN 15454509. 85:2016) 227–264. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014607.
 47. WILBIE, Danny; WALTHER, Johanna; MASTROBATTISTA, Enrico - Delivery Aspects of CRISPR/Cas for in Vivo Genome Editing. **Accounts of Chemical Research**. ISSN 15204898. 52:6 (2019) 1555–1564. doi: 10.1021/acs.accounts.9b00106.
 48. JINEK, Martin *et al.* - A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**. ISSN 10959203. 337:6096 (2012) 816–821. doi: 10.1126/science.1225829.
 49. CONG, Le *et al.* - Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... Zhang, F. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science (New York, N.Y.)*. **Science (New York, N.Y.)**. ISSN 15378276. 339:6121 (2013) 819–823. doi: 10.1126/science.1231143.Multiplex.
 50. GASIUNAS, Giedrius *et al.* - Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. ISSN 00278424. 109:39 (2012) 2579–2586. doi: 10.1073/pnas.1208507109.
 51. KNOTT, Gavin J.; DOUDNA, Jennifer A. - CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. **Science**. ISSN 10959203. 361:6405 (2018) 866–869. doi: 10.1126/science.aat5011.
 52. FENG ZHANG *et al.* - Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science**. ISSN 10959203. 339:6121 (2013) 816–819.
 53. PAQUET, Dominik *et al.* - Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. **Nature**. ISSN 14764687. 533:7601 (2016) 125–129. doi: 10.1038/nature17664.
 54. GHOSH, Debarati *et al.* - CRISPR-Cas9 a boon or bane: The bumpy road ahead to cancer therapeutics 06 Biological Sciences 0604 Genetics. **Cancer Cell International**. ISSN 14752867. 19:1 (2019) 1–10. doi: 10.1186/s12935-019-0726-0.

55. LIU, Ji *et al.* - Fast and Efficient CRISPR/Cas9 Genome Editing In Vivo Enabled by Bioreducible Lipid and Messenger RNA Nanoparticles. **Advanced Materials**. ISSN 15214095. 31:33 (2019). doi: 10.1002/adma.201902575.
56. AGHAMIRI, Shahin *et al.* - Non-viral siRNA delivery systems for pancreatic cancer therapy. **Biotechnology and Bioengineering**. ISSN 0006-3592. 2021). doi: 10.1002/bit.27869.
57. FATTAL, Elias; FAY, François - Nanomedicine-based delivery strategies for nucleic acid gene inhibitors in inflammatory diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**. ISSN 0169409X. 175:2021) 113809. doi: 10.1016/j.addr.2021.05.019.
58. HO, Pui Yan; YU, Ai Ming - Bioengineering of noncoding RNAs for research agents and therapeutics. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**. ISSN 17577012. 7:2 (2016) 186–197. doi: 10.1002/wrna.1324.
59. MAEDA, Hiroshi; NAKAMURA, Hideaki; FANG, Jun - The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. **Advanced Drug Delivery Reviews**. ISSN 0169409X. 65:1 (2013) 71–79. doi: 10.1016/j.addr.2012.10.002.
60. CUI, Hao *et al.* - Liver-Targeted Delivery of Oligonucleotides with N-Acetylgalactosamine Conjugation. **ACS Omega**. ISSN 2470-1343. 6:25 (2021) 16259–16265. doi: 10.1021/acsomega.1c01755.
61. GORDON, Siamon; TAYLOR, Philip R. - Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**. ISSN 14741733. 5:12 (2005) 953–964. doi: 10.1038/nri1733.
62. SUK, Jung Soo *et al.* - PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. ISSN 18728294. 99:2016) 28–51. doi: 10.1016/j.addr.2015.09.012.
63. EVERS, Melvin M.; TOONEN, Lodewijk J. A.; ROON-MOM, Willeke M. C. VAN - Antisense oligonucleotides in therapy for neurodegenerative disorders. **Advanced Drug Delivery Reviews**. ISSN 18728294. 87:2015) 90–103. doi: 10.1016/j.addr.2015.03.008.
64. EBRAHIMI, Zahra *et al.* - Overcoming the blood-brain barrier in neurodegenerative disorders and brain tumours. **IET Nanobiotechnology**. ISSN 17518741. 14:6 (2020) 441–448. doi: 10.1049/iet-nbt.2019.0351.

65. GÖKIRMAK, Tufan *et al.* - Overcoming the challenges of tissue delivery for oligonucleotide therapeutics. **Trends in Pharmacological Sciences**. ISSN 18733735. 42:7 (2021) 588–604. doi: 10.1016/j.tips.2021.04.010.
66. ACSADI, Gyula *et al.* - Safety and efficacy of nusinersen in spinal muscular atrophy: The EMBRACE study. **Muscle and Nerve**. ISSN 10974598. 63:5 (2021) 668–677. doi: 10.1002/mus.27187.
67. MENDONÇA, Monique C. P. *et al.* - Advances in the Design of (Nano)Formulations for Delivery of Antisense Oligonucleotides and Small Interfering RNA: Focus on the Central Nervous System. **Molecular Pharmaceutics**. ISSN 15438392. 18:4 (2021) 1491–1506. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c01238.
68. SCHLICH, Michele *et al.* - Cytosolic delivery of nucleic acids: The case of ionizable lipid nanoparticles. **Bioengineering and Translational Medicine**. ISSN 23806761. 6:2 (2021) 1–16. doi: 10.1002/btm2.10213.
69. DURYMANOV, Mikhail; REINEKE, Joshua - Non-viral delivery of nucleic acids: Insight into mechanisms of overcoming intracellular barriers. **Frontiers in Pharmacology**. ISSN 16639812. 9:AUG (2018) 1–15. doi: 10.3389/fphar.2018.00971.
70. RAZANI, Babak; WOODMAN, Scott E.; LISANTI, Michael P. - Caveolae: From cell biology to animal physiology. **Pharmacological Reviews**. ISSN 00316997. 54:3 (2002) 431–467. doi: 10.1124/pr.54.3.431.
71. XU, Emily; SALTZMAN, W. Mark; PIOTROWSKI-DASPIT, Alexandra S. - Escaping the endosome: assessing cellular trafficking mechanisms of non-viral vehicles. **Journal of Controlled Release**. ISSN 18734995. 335:February (2021) 465–480. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.05.038.
72. KIM, Byungji; PARK, Ji Ho; SAILOR, Michael J. - Rekindling RNAi Therapy: Materials Design Requirements for In Vivo siRNA Delivery. **Advanced Materials**. ISSN 15214095. 31:49 (2019) 1–23. doi: 10.1002/adma.201903637.
73. MUKALEL, Alvin J. *et al.* - Nanoparticles for nucleic acid delivery: Applications in cancer immunotherapy. **Cancer Letters**. ISSN 18727980. 458:April (2019) 102–112. doi: 10.1016/j.canlet.2019.04.040.
74. HACHIYA, Naomi *et al.* - Nuclear Envelope and Nuclear Pore Complexes in Neurodegenerative Diseases—New Perspectives for Therapeutic Interventions. **Molecular Neurobiology**. ISSN 15591182. 58:3 (2021) 983–995. doi: 10.1007/s12035-

020-02168-x.

75. CROOKE, Stanley T.; VICKERS, Timothy A.; LIANG, Xue Hai - Phosphorothioate modified oligonucleotide-protein interactions. **Nucleic Acids Research**. ISSN 13624962. 48:10 (2021) 5235–5253. doi: 10.1093/NAR/GKAA299.
76. CHIU, Ya Lin; RANA, Tariq M. - siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. **Rna**. ISSN 13558382. 9:9 (2003) 1034–1048. doi: 10.1261/rna.5103703.
77. BENNETT, C. Frank; SWAYZE, Eric E. - RNA targeting therapeutics: Molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. ISSN 03621642. 50:2010) 259–293. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.010909.105654.
78. CAMPBELL, Meghan A.; WENGEL, Jesper - Locked vs. unlocked nucleic acids (LNA vs. UNA): Contrasting structures work towards common therapeutic goals. **Chemical Society Reviews**. ISSN 14604744. 40:12 (2011) 5680–5689. doi: 10.1039/c1cs15048k.
79. GODDARD, Layla R. *et al.* - An investigation into the potential of targeting escherichia coli rne mrna with locked nucleic acid (Lna) gapmers as an antibacterial strategy. **Molecules**. ISSN 14203049. 26:11 (2021) 1–15. doi: 10.3390/molecules26113414.
80. LAM, Jenny K. W. *et al.* - siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**. ISSN 21622531. 4:9 (2015) e252. doi: 10.1038/mtna.2015.23.
81. SHENG, Lei *et al.* - Comparison of the efficacy of MOE and PMO modifications of systemic antisense oligonucleotides in a severe SMA mouse model. **Nucleic Acids Research**. ISSN 13624962. 48:6 (2020) 2853–2865. doi: 10.1093/nar/gkaa126.
82. CHEN, Xiuhui *et al.* - RNA interference-based therapy and its delivery systems. **Cancer and Metastasis Reviews**. ISSN 15737233. 37:1 (2018) 107–124. doi: 10.1007/s10555-017-9717-6.
83. CHOUDHURY, Sourav R. *et al.* - Viral vectors for therapy of neurologic diseases. **Neuropharmacology**. ISSN 18737064. 120:2017) 63–80. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.02.013.
84. DOUDNA, Jennifer A. - The promise and challenge of therapeutic genome editing. **Nature**. ISSN 14764687. 578:7794 (2020) 229–236. doi: 10.1038/s41586-020-1978-5.
85. WANG, Yuhua *et al.* - Delivery of oligonucleotides with lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**. ISSN 18728294. 87:2015) 68–80. doi:

10.1016/j.addr.2015.02.007.

86. SCHEIDELER, Marcel; VIDAKOVIC, Ivan; PRASSL, Ruth - Lipid nanocarriers for microRNA delivery. **Chemistry and Physics of Lipids**. ISSN 18732941. 226:October 2019 (2020) 104837. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2019.104837.
87. ZHDANOV, Vladimir P. - Intracellular RNA delivery by lipid nanoparticles: Diffusion, degradation, and release. **BioSystems**. ISSN 18728324. 185:September (2019). doi: 10.1016/j.biosystems.2019.104032.
88. KAUFFMAN, Kevin J.; WEBBER, Matthew J.; ANDERSON, Daniel G. - Materials for non-viral intracellular delivery of messenger RNA therapeutics. **Journal of Controlled Release**. ISSN 18734995. 240:2016) 227–234. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.12.032.
89. KACZMAREK, James C.; KOWALSKI, Piotr S.; ANDERSON, Daniel G. - Advances in the delivery of RNA therapeutics: From concept to clinical reality. **Genome Medicine**. ISSN 1756994X. 9:1 (2017) 1–16. doi: 10.1186/s13073-017-0450-0.
90. CULLIS, Pieter R.; HOPE, Michael J. - Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies. **Molecular Therapy**. ISSN 15250024. 25:7 (2017) 1467–1475. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.03.013.
91. KRISTEN, Arnt V. *et al.* - Patisiran, an RNAi therapeutic for the treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. **Neurodegenerative disease management**. ISSN 17582032. 9:1 (2019) 5–23. doi: 10.2217/nmt-2018-0033.
92. ONER, Ezgi; KOTMAKCI, Mustafa; KANTARCI, Ayse Gulden - A promising approach to develop nanostructured lipid carriers from solid lipid nanoparticles: preparation, characterization, cytotoxicity and nucleic acid binding ability. **Pharmaceutical Development and Technology**. ISSN 10979867. 25:8 (2020) 936–948. doi: 10.1080/10837450.2020.1759630.
93. SUÑÉ-POU, Marc *et al.* - Improved synthesis and characterization of cholesteryl oleate-loaded cationic solid lipid nanoparticles with high transfection efficiency for gene therapy applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. ISSN 18734367. 180:April (2019) 159–167. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.04.037.
94. YU, Yong Hee *et al.* - Cationic solid lipid nanoparticles for co-delivery of paclitaxel and siRNA. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. ISSN 09396411. 80:2 (2012) 268–273. doi: 10.1016/j.ejpb.2011.11.002.
95. NASERI, Neda; VALIZADEH, Hadi; ZAKERI-MILANI, Parvin - Solid lipid nanoparticles

- and nanostructured lipid carriers: Structure preparation and application. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**. ISSN 22517308. 5:3 (2015) 305–313. doi: 10.15171/apb.2015.043.
96. TARATULA, Oleh *et al.* - Nanostructured lipid carriers as multifunctional nanomedicine platform for pulmonary co-delivery of anticancer drugs and siRNA. **Journal of Controlled Release**. ISSN 18734995. 171:3 (2013) 349–357. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.04.018.
 97. SUBRAMANIAM, Bavani; SIDDIK, Zahid H.; NAGOOR, Noor Hasima - Optimization of nanostructured lipid carriers: understanding the types, designs, and parameters in the process of formulations. **Journal of Nanoparticle Research**. ISSN 1572896X. 22:6 (2020). doi: 10.1007/s11051-020-04848-0.
 98. AGHAMIRI, Shahin *et al.* - Nonviral siRNA delivery systems for pancreatic cancer therapy. **Biotechnology and Bioengineering**. ISSN 10970290. 118:10 (2021) 3669–3690. doi: 10.1002/bit.27869.
 99. YIN, Hao *et al.* - Non-viral vectors for gene-based therapy. **Nature Reviews Genetics**. ISSN 14710064. 15:8 (2014) 541–555. doi: 10.1038/nrg3763.
 100. YA-, Q. I. U. Chong Zhang; JIAN-, Wang - Delivery Systems for Cancer Therapy. Figure 1 (2014) 1885–1892.
 101. CAVALLARO, Gennara *et al.* - Polymeric nanoparticles for siRNA delivery: Production and applications. **International Journal of Pharmaceutics**. ISSN 18733476. 525:2 (2017) 313–333. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.04.008.
 102. GREEN, Jordan J.; LANGER, Robert; ANDERSON, Daniel G. - Yields Insight into Nonviral Gene Delivery. **Accounts of Chemical Research**. ISSN 15378276. 41:6 (2008) 749–759.
 103. DUVALL, Craig L. *et al.* - **Gene Delivery into Cells and Tissues**. ISBN 9780123983589.
 104. MATTA, Jihane; MAALOUF, Rita - Delivery of siRNA therapeutics: PLGA nanoparticles approach. **Frontiers in Bioscience - Scholar**. ISSN 19450524. 11:1 (2019) 56–74. doi: 10.2741/S526.
 105. BYEON, Yeongseon *et al.* - CD44-targeting PLGA nanoparticles incorporating paclitaxel and FAK siRNA overcome chemoresistance in epithelial ovarian cancer. **Cancer Research**. ISSN 15387445. 78:21 (2018) 6247–6256. doi: 10.1158/0008-

5472.CAN-17-3871.

106. MUKHERJEE, Anubhab *et al.* - Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a next generation drug delivery platform: State of the art, emerging technologies, and perspectives. **International Journal of Nanomedicine**. ISSN 11782013. 14:2019) 1937–1952. doi: 10.2147/IJN.S198353.
107. ZHANG, Li; ZHANG, Na - How nanotechnology can enhance docetaxel therapy. **International Journal of Nanomedicine**. ISSN 11769114. 8:2013) 2927–2941. doi: 10.2147/IJN.S46921.
108. PERSANO, Stefano *et al.* - Lipopolyplex potentiates anti-tumor immunity of mRNA-based vaccination. **Biomaterials**. ISSN 18785905. 125:2017) 81–89. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.02.019.
109. LIN, Yao Xin *et al.* - RNA nanotechnology-mediated cancer immunotherapy. **Theranostics**. ISSN 18387640. 10:1 (2020) 281–299. doi: 10.7150/thno.35568.
110. LEI, Yifeng *et al.* - Gold nanoclusters-assisted delivery of NGF siRNA for effective treatment of pancreatic cancer. **Nature Communications**. ISSN 20411723. 8:2017). doi: 10.1038/ncomms15130.
111. OSBORN, Maire F.; KHVOROVA, Anastasia - Improving siRNA Delivery in Vivo Through Lipid Conjugation. **Nucleic Acid Therapeutics**. ISSN 21593345. 28:3 (2018) 128–136. doi: 10.1089/nat.2018.0725.
112. NAIR, Jayaprakash K. *et al.* - Impact of enhanced metabolic stability on pharmacokinetics and pharmacodynamics of GalNAc-siRNA conjugates. **Nucleic Acids Research**. ISSN 13624962. 45:19 (2017) 10969–10977. doi: 10.1093/nar/gkx818.
113. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Spinraza - European Medicines Agency**. (2019) [Consult. 29 jul. 2021]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spinraza>
114. U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION - **FDA approves first drug for spinal muscular atrophy**. (2017) [Consult. 29 jul. 2021]. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-drug-spinal-muscular-atrophy>
115. U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION - **Exondys 51 (eteplirsen) injection Label**. (2016) [Consult. 8 out. 2021]. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/206488lbl.pdf

116. U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION - **Drug Approval Package: Exondys 51 Injection (eteplirsen)**. (2016) [Consult. 29 jul. 2021]. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2016/206488_toc.cfm
117. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Recusa da Autorização de Introdução no Mercado para o Exondys (eteplirsen)**. (2018) [Consult. 29 jul. 2021]. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/smop-initial/questions-answers-refusal-marketing-authorisation-exondys-eteplirsen-outcome-re-examination_pt.pdf
118. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Resumo das Características do Medicamento - inotersen**. (2018) [Consult. 29 jul. 2021]. Disponível em: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2019/20190919145831/anx_145831_pt
119. U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION - **Drug Approval Package: Tegsedi (inotersen)**. (2018) [Consult. 29 jul. 2021]. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/211172Orig1s000TOC.cfm
120. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Tegsedi | European Medicines Agency**. (2018) [Consult. 29 jul. 2021]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tegsedi#authorisation-details-section>
121. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Onpattro | European Medicines Agency**. (2018) [Consult. 8 out. 2021]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/onpattro#authorisation-details-section>
122. U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION - **Drug Approval Package: Onpattro (patisiran)**. (2018) [Consult. 8 out. 2021]. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/210922orig1s000toc.cfm
123. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Resumo das Características do Medicamento: Onpattro (patisiran)**. (2018) [Consult. 10 out. 2021]. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/onpattro-epar-product-information_pt.pdf
124. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Waylivra | European Medicines Agency**. (2019) [Consult. 9 out. 2021]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/waylivra#authorisation-details-section>
125. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Resumo das Características do Medicamento - Volanesorsen**. (2019) [Consult. 9 out. 2021]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/waylivra-epar-product->

information_pt.pdf

126. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Resumo das Características do Medicamento - Givosiran**. (2020) [Consult. 9 out. 2021]. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/givlaari-epar-product-information_pt.pdf
127. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Givlaari | European Medicines Agency**. (2020) [Consult. 9 out. 2021]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/givlaari#authorisation-details-section>
128. U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION - **Drug Approval Package: GIVLAARI (givosiran)**. (2019) [Consult. 9 out. 2021]. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/212194Orig1s000TOC.cfm
129. U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION - **Full Prescribing Information: Vyondys 53 (golodirsen)**. (2019) [Consult. 9 out. 2021]. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/211970s000lbl.pdf
130. U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION - **Drug Approval Package: Vyondys 53 (golodirsen)**. (2019) [Consult. 9 out. 2021]. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/211970Orig1s000TOC.cfm
131. U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION - **Full Prescribing Information: Viltepso (viltolarsen)**. (2020) [Consult. 9 out. 2021]. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/212154s000lbl.pdf
132. U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION - **FDA Approves Targeted Treatment for Rare Duchenne Muscular Dystrophy Mutation**. (2020) [Consult. 9 out. 2021]. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-targeted-treatment-rare-duchenne-muscular-dystrophy-mutation>
133. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **EU/3/20/2282: Orphan designation for the treatment of Duchenne muscular dystrophy**. (2020) [Consult. 9 out. 2021]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu3202282>
134. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Oxlumo | European Medicines Agency**. (2020) [Consult. 9 out. 2021]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/oxlumo>

135. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Resumo das Características do Medicamento: Lumasiran.** (2020) [Consult. 9 out. 2021]. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/oxlumo-epar-product-information_en.pdf
136. U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION - **FDA-Approved Drugs - Lumasiran.** (2020) [Consult. 9 out. 2021]. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&varApplNo=214103>
137. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Leqvio | European Medicines Agency.** (2020) [Consult. 9 out. 2021]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/leqvio>
138. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Resumo das Características do Medicamento: Leqvio (inclisiran).** (2020) [Consult. 9 out. 2021]. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/leqvio-epar-product-information_pt.pdf
139. LAMB, Yvette N. - BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine: First Approval. **Drugs.** ISSN 11791950. 81:4 (2021) 495–501. doi: 10.1007/s40265-021-01480-7
140. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Resumo das Características do Medicamento: Comirnaty.** (2020) [Consult. 9 out. 2021]. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/comirnaty-epar-product-information_pt.pdf
141. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Comirnaty | European Medicines Agency.** (2020) [Consult. 9 out. 2021]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/comirnaty>
142. U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION - **Comirnaty and Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine | FDA.** (2020) [Consult. 9 out. 2021]. Disponível em: <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/comirnaty-and-pfizer-biontech-covid-19-vaccine>
143. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Spikevax (previously COVID-19 Vaccine Moderna) | European Medicines Agency.** (2021) [Consult. 10 out. 2021]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spikevax#authorisation-details-section>

144. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Resumo das Características do Medicamento: Spikevax.** (2021) [Consult. 10 out. 2021]. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna-epar-product-information_pt.pdf
145. U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION - **Moderna COVID-19 Vaccine | FDA.** (2020) [Consult. 10 out. 2021]. Disponível em: <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/moderna-covid-19-vaccine>
146. BENIZRI, Sebastien *et al.* - Bioconjugated Oligonucleotides: Recent Developments and Therapeutic Applications. **Bioconjugate Chemistry.** ISSN 15204812. 30:2 (2019) 366–383. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00761.

Anexo

Vaccines	Advantages	Disadvantages
Conventional mRNA Self-amplifying mRNA	synthetic production; egg and cell free	concerns with instability
	rapid and scalable production compared with other vaccine platforms (e.g., subunit proteins, viral vectors)	limited immunogenicity data in humans
	noninfectious, non-integrating, and naturally degraded	potential toxic effect of free extracellular mRNA ^{164,165}
	expression <i>in situ</i> to produce antigens with structure unaltered by <i>in vitro</i> manufacturing process	inflammation due to enhanced type I IFN activation
	expression <i>in situ</i> to stimulate innate immune response, enhancing broad T and B cell immune responses	efficient delivery required to deliver and launch self-amplifying mRNA
	-	efficient delivery required to deliver and/or provide adjuvanting effect for conventional mRNA
Conventional mRNA	-	unproven toxicity profiles of delivery system components
	shorter RNA length compared with self-amplifying mRNA	potential toxicity from modified nucleotides
	applicable to nucleoside base modification	shorter duration of expression
	direct antigen expression from mRNA	higher effective RNA doses
Self-amplifying mRNA	no risk of anti-vector immunity	-
	enhanced and prolonged antigen expression	potential elevated inflammation due to self-amplification
	lower effective RNA doses, potentially resulting in better safety	longer RNA length, may lead to more challenging production of high-quality RNA compared with conventional mRNA
	intrinsic adjuvant effect	interaction between nsPs and host factors yet to be addressed
	potential apoptosis of vaccine-carrying cells due to vaccine self-amplification, leading to enhanced cross-presentation	-
	option for single-vector delivery of multiple or complex antigens	-

IFN, interferon; nsPs, nonstructural proteins.

Anexo I – Adaptado de MARUGGI, G., ZHANG, C., LI, J., ULMER, J. B. & YU, D. **mRNA as a Transformative Technology for Vaccine Development to Control Infectious Diseases.** *Mol. Ther.* **27**, 757–772 (2019).