



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Bianca Filipa Rodrigues Silva

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “O Papel do RNA na Biologia Sintética: Processos de Síntese e Controlo de RNA e o Uso na Terapêutica”, referente à unidade curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Maria Helena Costa Neves Correia Amado, da Dra. Cláudia Corker Arranja e do Professor Doutor Sérgio Paulo Magalhães Simões, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Bianca Filipa Rodrigues Silva

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “O Papel do RNA na Biologia Sintética: Processos de Síntese e Controlo de RNA e o Uso na Terapêutica”, referente à unidade curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Maria Helena Costa Neves Correia Amado, da Dra. Cláudia Corker Arranja e do Professor Doutor Sérgio Paulo Magalhães Simões, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2022

Eu, Bianca Filipa Rodrigues Silva, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2017246550, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “O Papel do RNA na Biologia Sintética: Processos de Síntese e Controlo de RNA e o Uso na Terapêutica” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de estágio 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, 6 de setembro de 2022

A handwritten signature in black ink, reading "Bianca Filipa Rodrigues Silva", is written over a horizontal line.

(Bianca Filipa Rodrigues Silva)

ÍNDICE

PARTE I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

ABREVIATURAS	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. FARMÁCIA LUCIANO & MATOS	16
3. ANÁLISE SWOT	16
3.1. PONTOS FORTES.....	17
3.1.1. Organização e Estrutura do Plano de Estágio	17
3.1.2. Medicamentos Manipulados.....	18
3.1.3. Preparação Individualizada da Medicação.....	20
3.1.4. Consultas de Podologia e Pé Diabético	21
3.1.5. Filosofia KAIZEN.....	22
3.2. PONTOS FRACOS.....	22
3.2.1. Dificuldade em associar o nome comercial à nomenclatura DCI	22
3.2.2. Dificuldade na Análise de Receitas Manuais	23
3.2.3. Inexperiência no Atendimento	24
3.3. OPORTUNIDADES.....	24
3.3.1. Auditoria Interna.....	24
3.3.2. Possibilidade de frequentar formações presenciais.....	25
3.3.3. Heterogeneidade dos utentes na farmácia.....	26
3.4. AMEAÇAS.....	26
3.4.1. Testes covid-19 participados.....	26
3.4.2. Falta de confiança nos estagiários.....	27
4. CONCLUSÃO	28
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
ANEXOS	31

PARTE II – Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

1. INTRODUÇÃO	43
2. BLUEPHARMA	48
3. ANÁLISE SWOT	49
3.1. PONTOS FORTES.....	49
3.1.1. Receção, acolhimento e integração	49
3.1.2. Equipa e ambiente de trabalho	50
3.1.3. Formações Internas.....	50
3.1.4. Plano de Estágio	51
3.1.5. Contacto com os diversos equipamentos.....	52
3.1.6. Metodologia KAIZEN.....	53
3.2. PONTOS FRACOS	53
3.2.1. Conhecimentos sobre o manuseamento de equipamentos laboratoriais	53
3.2.2. Falta de conhecimentos sobre o software Waters Empower™	54
3.3. OPORTUNIDADES	54
3.3.1. Processo de admissão	54
3.3.2. Experiência em Indústria Farmacêutica.....	55
3.3.3. Aprofundamento da componente laboratorial.....	55
3.3.4. Ferramentas de Trabalho/ Desenvolvimento de <i>soft skills</i> e domínio do <i>software</i> Microsoft Teams.....	56
3.4. AMEAÇAS.....	56
3.4.1. Reconhecimento de estágio curricular em Indústria Farmacêutica	56
3.4.2. Plano Curricular do MICF	Erro! Marcador não definido.
4. CONCLUSÃO	58
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

PARTE III – Monografia "O Papel do RNA na Biologia Sintética: Processos de Síntese e Controlo de RNA e o Uso na Terapêutica"

ABSTRACT	63
RESUMO	65
ABREVIATURAS	67
INTRODUÇÃO	69
1. RNA NÃO CODIFICANTE: RNA REGULATÓRIO	71
2. SMALL INTERFERENCE RNA	73
2.1- MECANISMO DE BIOSÍNTESE	73
2.2- POTENCIAL E OBSTÁCULOS/DESAFIOS NO USO DE siRNA.....	75
2.3- TERAPÊUTICAS EXISTENTES NO MERCADO- ONPATTRO	78
3- MICRORNA	80
3.1 MECANISMOS DE BIOSÍNTESE: VIA CANÓNICA E NÃO CANÓNICA	80
3.2 PAPEL DO miRNA NO CANCRO	82
3.3 MODULAÇÃO TERAPÊUTICA DOS miRNAs	83
4. VACINAS	87
4.1 PRÍNCIPIOS E SÍNTESE DE mRNA.....	88
4.2 SISTEMAS DE ENTREGA DE mRNA.....	90
4.2.1 Poliplexos e Lipoplexos	90
4.2.2 Nanopartículas Lípidicas	90
5. CONCLUSÃO	94
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
Anexo I	99

PARTE I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

-Farmácia Luciano & Matos

Estágio orientado pela
Dra. Maria Helena Costa Neves Correia Amado

ABREVIATURAS

COVID-19 - do inglês, Coronavirus disease-2019

DCI - Denominação Comum Internacional

FGP - Formulário Galénico Português

MNSRM - Medicamento não Sujeito a Receita Médica

PIM - Preparação Individualizada da Medicação

PSP - Polícia de Segurança Pública

SWOT - do inglês Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats

I. INTRODUÇÃO

A atividade desenvolvida pelo farmacêutico, nomeadamente na área da farmácia comunitária fundamenta-se como sendo um elo vital, que contribui para a ligação de proximidade existente entre o Sistema Nacional de Saúde e o cidadão. Tal conexão deve-se essencialmente a dois fatores preponderantes. São eles a vasta distribuição, que as farmácias apresentam geograficamente em todo território português e a confiança depositada pela população no farmacêutico, nomeadamente no seu conhecimento técnico-científico e na sua competência profissional.

A Farmácia Comunitária apresenta-se assim como sendo um setor, posicionado estrategicamente dentro no sistema de saúde, com capacidade de “integração e articulação na rede de cuidados de saúde primários”. É então da responsabilidade destas unidades de saúde e nomeadamente do farmacêutico comunitário garantir a “acessibilidade ao medicamento e a equidade na prestação de cuidados de saúde de qualidade a todos os cidadãos, independentemente da sua localização geográfica”, os quais são a base dos pilares, onde se encontra assente todo o sistema de saúde português.

Desta forma, pela posição privilegiada que ocupa na comunidade e enquanto agente de saúde pública, o farmacêutico comunitário desempenha diversas funções importantes, inerentes à promoção da saúde e do bem-estar da população, à dispensa racional de medicamentos, ao aconselhamento farmacêutico personalizado e à fomentação na adesão à terapêutica.

Assim, após 5 anos repletos de uma vasta formação académica exigente e diferenciada, o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas culmina na realização de um estágio curricular, o qual é a oportunidade ideal para colocar em prática os conhecimentos adquiridos ao longo do curso e experienciar um pouco da realidade profissional que advém desta atividade.

O meu estágio curricular em Farmácia Comunitária realizou-se na Farmácia Luciano & Matos, em Coimbra, iniciado no dia 10 de janeiro de 2022 e terminado no dia 30 de abril de 2022. O mesmo decorreu sob orientação da Dra. Maria Helena Amado.

O presente relatório tem como principal objetivo a descrição das principais experiências e atividades que desenvolvi ao longo deste estágio. Este também pressupõe uma reflexão crítica introspetiva, sob forma de análise SWOT, onde serão categorizados os pontos fortes e os

pontos fracos, os quais são avaliados internamente, bem como as possíveis ameaças e oportunidades, as quais são avaliadas externamente.

2. FARMÁCIA LUCIANO & MATOS

A Farmácia Luciano & Matos, em funcionamento desde o ano de 1929, localiza-se na Praça 8 de Maio em Coimbra. Tal localização é vista como sendo privilegiada, uma vez que se situa em plena baixa de Coimbra, o que possibilita que a farmácia possua um leque de utentes variado e abrangente, desde residentes na zona urbana e da periferia da cidade a utentes que vêm a Coimbra para usufruir de serviços médicos e hospitalares².

Desde o ano de 1995, que a farmácia Luciano & Matos é propriedade da Dra. Maria Helena Costa Neves Correia Amado, a qual assume também a posição de diretora técnica. Em dezembro de 2008, a Farmácia passou de empresa em nome individual para sociedade, assumindo a designação de CNCA Farmácias, Lda. - Farmácia Luciano & Matos².

De 2009 a 2019, integrou o Grupo Holon, isto é, uma marca de Farmácias autónomas e independentes, que partilham a mesma marca, imagem e forma de estar e cujo principal objetivo prende-se com a otimização da atividade farmacêutica quotidiana, prestando um serviço de elevada qualidade, totalmente focado no utente³.

A partir de outubro de 2019, a Farmácia passou também a fazer parte dos Grupos BIDS Circle e EZFY, os quais são respetivamente grupos de compras e de serviços, que através da inovação e tecnologia, visam melhorar, facilitar e simplificar a vida das pessoas com doença crónica, através de programas personalizados capazes de promover a adesão, a efetividade e a segurança das terapêuticas farmacológicas instituídas, fornecendo simultaneamente o suporte de aprovisionamento às farmácias⁴.

3. ANÁLISE SWOT

PONTOS FORTES	PONTOS FRACOS
<ul style="list-style-type: none">• Organização e Estrutura do Plano de Estágio• Medicamentos Manipulados• Preparação individualizada da medicação• Consultas de Podologia e Pé Diabético• Filosofia KAIZEN	<ul style="list-style-type: none">• Dificuldade em associar o nome comercial à nomenclatura DCI• Dificuldade na análise de receitas manuais• Inexperiência no atendimento
OPORTUNIDADES	AMEAÇAS
<ul style="list-style-type: none">• Auditoria interna• Possibilidade de frequentar formações presenciais• Heterogeneidade dos utentes na farmácia	<ul style="list-style-type: none">• Testes covid-19 comparticipados• Falta de confiança nos estagiários• Medicamentos esgotados

3.1. PONTOS FORTES

3.1.1. Organização e Estrutura do Plano de Estágio

O plano de estágio delineado pela Farmácia Luciano & Matos compreende uma introdução gradual dos estagiários nas diferentes tarefas desempenhadas pelo farmacêutico. O facto de haver esta integração, passo a passo permite estabelecer uma sequência lógica dos eventos que decorrem na farmácia e constitui-se com um método de consolidação dos conceitos aprendidos, essenciais à execução das tarefas na prática quotidiana. As funções executadas na prática eram sustentadas por uma explicação teórica prévia e sempre que possível antecedidas de uma componente observacional.

O estágio iniciou-se no *back office*, ao nível da receção e armazenamento de encomendas, no qual foi estabelecido o primeiro contacto com o software SIFARMA 2000®. Aqui aprendi a executar os procedimentos de entrada de encomendas e de armazenamento de produtos no *robot*, no frigorífico, nas gavetas e nos lineares de exposição existentes na zona de atendimento. Além disso, nesta fase fiquei também a compreender melhor a logística subjacente à gestão de stocks e de reservas. O desempenhar destas tarefas foi na minha perspetiva crucial, pois permitiu familiarizar-me com os medicamentos e produtos existentes

na farmácia, bem como saber a sua respetiva localização física, o que contribuiu imensamente para as etapas subsequentes.

Simultaneamente, durante a primeira semana, devido à grande afluência que havia para a realização de testes de antigénio de Covid-19, comecei também a ter as primeiras interações com o público, nomeadamente ao nível do agendamento e inscrição para testes. Este contacto tão precoce com os utentes, permitiu desde logo sentir-me mais confortável e segura para as fases posteriores de atendimento e aconselhamento.

Seguidamente, foram-me dadas instruções relativas ao gabinete do utente, de forma a relembrar os fundamentos teóricos e os procedimentos práticos necessários para a medição e avaliação dos diversos parâmetros bioquímicos, como a glicémia, pressão arterial, colesterol total, triglicéridos e bioimpedância. Nesta fase, fui encorajada a prática de situações de contexto real com outros estagiários, para que pudéssemos praticar e manipular os diferentes equipamentos, o que foi fundamental para nos sentirmos mais confortáveis e confiantes.

Uma outra função que me foi delegada relaciona-se com o aviamento, faturação e regularização de vendas suspensas para instituições, com as quais a farmácia tem protocolos. Na minha perspetiva, esta tarefa foi também ela muito importante, pois possibilitou praticar e melhorar certos aspetos, como a minha agilidade, destreza e rapidez no uso do software informático.

Assim, na minha opinião, a estruturação e o planeamento sequencial do estágio assume-se como um forte ponto positivo desta experiência, uma vez que permitiu familiarizar-me de forma gradual e natural com todos os procedimentos em que o farmacêutico se encontra envolvido dentro da farmácia, o que culminou numa maior confiança e autonomia no resto do tempo de estágio, nomeadamente na interação e aconselhamento dos utentes, durante o atendimento.

3.1.2. Medicamentos Manipulados

Um medicamento manipulado define-se como sendo “qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico⁵”, sempre segundo a legislação e informação científica mais atual existente, das quais destacam-se as Normas Gerais das Boas Práticas de Farmácia e as “Boas práticas a observar na preparação de medicamentos manipulados em farmácia de oficina e hospitalar”. A sua evolução

advém da necessidade que existe em adaptar e individualizar a terapêutica, de acordo com as características de cada indivíduo. Estes são normalmente prescritos, quando não existe no mercado, uma alternativa adequada, que cumpra todas as exigências necessárias. Estes requisitos podem ser face à “substância ativa ou combinação de substâncias ativas, dose adaptada à indicação terapêutica e características metabólicas do utente, intolerância a um ou mais dos componentes da fórmula industrial, forma farmacêutica viável, ou adesão à terapêutica⁶”.

Com o passar dos anos têm-se vindo a verificar uma diminuição na preparação de medicamentos manipulados, a nível das farmácias comunitárias, resultante do elevado ritmo imposto na produção e desenvolvimento de medicamentos por parte das indústrias farmacêuticas, cada vez a um custo mais baixo. No entanto, esta situação não é a realidade que experienciei na Farmácia Luciano & Matos. A pandemia neste caso, levou a um aumento significativo nos pedidos para preparação de medicamentos manipulados, tornando-se assim uma das farmácias de referência da zona centro, para manipulados de uso humano e uso veterinário. O número de pedidos para manipulados durante o meu período de estágio era tão elevado, que existiam diariamente, pelo menos duas farmacêuticas, totalmente dedicadas à sua preparação, sendo justificado em certos dias a presença de uma terceira farmacêutica no laboratório.

Na parte final do meu estágio tive ainda a oportunidade de preparar uma solução de espirolactona a 2%. A espirolactona atua como antagonista competitivo da aldosterona no túbulo contornado distal do rim, sendo por essa razão usada frequentemente como diurético e anti-hipertensor. Em Portugal, esta é apenas comercializada sob a forma de especialidades farmacêuticas sólidas, daí advir a necessidade da preparação de formulações líquidas de espirolactona, nomeadamente dirigida para o contexto pediátrico. Neste caso específico, preparámos uma suspensão, visto que esta substância é muito pouco solúvel em água.

Previamente à execução do manipulado, foi-me explicado de forma sucinta, quais os requisitos legais (Anexo II), que têm de ser obrigatoriamente cumpridos pelo laboratório de manipulados e os passos inerentes à preparação desta suspensão, com recurso à monografia da Suspensão Oral de Espirolactona a 0,5%, incluída no Formulário Galénico Português (FGP).

Um aspeto que é importante realçar foi o uso de SyrSpend SF[®], como veículo da suspensão, ao invés do veículo preconizado no FGP. Esta alteração advém do facto do SyrSpend SF[®] não

conter parabenos e açúcares na sua composição e apresentar um prazo de utilização (90 dias) superior ao veículo preconizado para a Preparação de Soluções e Suspensões Oraís (14 dias no frigorífico).

Durante a preparação do manipulado, é fundamental o preenchimento da ficha de preparação (Anexo III), no qual está incluída além do procedimento passo a passo, uma diversidade de informações, relativas às matérias primas utilizadas, material de embalagem, prazo de utilização e condições de conservação, rotulagem, requisitos de verificação e dados do utente e prescritor.

De seguida procede-se à elaboração do rótulo que constará na embalagem, sendo importante salientar a necessidade de anexar uma cópia do mesmo (Anexo IV), datada e rubricada à ficha de preparação. Além disso é também nesta etapa, que é efetuado o cálculo do preço de venda, o qual tem por base a Portaria n.º 769/2004, de 1 de julho⁷, a qual engloba três critérios: matérias primas, honorários e material de embalagem.

3.1.3. Preparação Individualizada da Medicação

Uma das funções prioritárias do farmacêutico passa por assegurar e promover a utilização correta, segura e efetiva do medicamento, tendo neste caso em especial consideração o fator de adesão não voluntária à terapêutica. Assim sendo, uma das formas de melhorar este último aspeto é a implementação de um serviço de preparação individualizada da medicação (PIM) nas farmácias. Este é um serviço desempenhado pelo farmacêutico, que consiste na organização de formas sólidas orais, de acordo com a posologia prescrita, numa fita, dividida em vários alvéolos, devidamente identificados, com o nome do utente e informação relativa ao que consta no seu interior e o momento correto da toma⁸.

Este é um serviço que a farmácia disponibiliza aos seus utentes, no entanto a maioria do tempo alocado à prestação deste serviço, está direcionado à preparação da medicação para utentes em instituições, com as quais a farmácia tem protocolos. Neste caso em específico, os farmacêuticos não têm um contacto direto com o utente, sendo a equipa de enfermagem da instituição o intermediário. No entanto para os utentes da farmácia, como o ato de dispensa é muitas das vezes feito pessoalmente é importante ceder oralmente toda a informação que se considerar relevante, para a correta administração e uso dos medicamentos, mesmo que esta já tenha sido referida ou se encontre escrita no dispositivo.

Durante o meu estágio foi-me dada a oportunidade de colaborar na realização de PIMs e da sua correção, o que considereei uma experiência enriquecedora, na medida em que me permitiu contactar com as características organolépticas dos mais variados medicamentos, o que posteriormente se revelou como sendo uma mais-valia para o atendimento, uma vez que ainda existem muitos utentes, que se referem à sua medicação habitual através do aspeto, nomeadamente formato, tamanho e cor.

Tendo tudo isto em conta, considero que este serviço apresenta diversos benefícios, nomeadamente como um recurso no combate à adesão não involuntária à terapêutica, destacando-se como sendo particularmente vantajoso para utentes polimedicados ou com regimes terapêuticos complexos, utentes com dificuldades no processo de uso de medicamentos e utentes com limitações físicas, dificuldades cognitivas ligeiras e/ou pouca autonomia no seu quotidiano⁸.

3.1.4. Consultas de Podologia e Pé Diabético

Além da medição dos parâmetros bioquímicos no gabinete de utente, a Farmácia Luciano & Matos dispõe também de outros serviços, dos quais destaco as consultas de podologia e de pé diabético. Estas consultas, ao contrário das restantes medições que podem ser realizadas no momento em que são solicitadas pelo utente, são sujeitas a marcação prévia, sendo realizadas periodicamente.

Este serviço é da responsabilidade de um profissional externo à farmácia, com experiência nesta área e tem como principal objetivo melhorar a qualidade de vida dos utentes. Para este serviço, a farmácia dispõe de um gabinete próprio, munido com o equipamento específico e necessário para este tipo de serviço e para que o utente se sinta confortável e seguro. A existência deste serviço constitui-se como uma vantagem para a farmácia, permitindo o seu destaque na comunidade e fidelização de utentes.

Desta forma, considero que estas consultas e a presença destes profissionais na farmácia, foram uma mais-valia para o meu estágio, pois permitiram a partilha de conhecimento nesta área, que muitas das vezes é um ponto mais fraco na nossa formação.

3.1.5. Filosofia KAIZEN

A palavra KAIZEN divide-se em KAI = mudar e ZEN = para melhor. Ou seja, essencialmente significa “mudar para melhor”. Esta filosofia, com origem no Japão, apresenta como princípio fundamental a melhoria contínua dos resultados de uma empresa. Neste caso específico tratando-se de uma farmácia, o foco está assente na melhoria da qualidade dos vários serviços prestados e no aumento da sua competitividade a longo prazo. Para que isto seja possível é necessário a participação de todos os colaboradores e a criação de um sistema de gestão que permita a rentabilização do tempo e o aumento da produtividade.

Existem diversas medidas que foram adotadas pela farmácia, com vista a melhoria contínua. Uma delas é a existência de um quadro numa zona visível, contendo uma lista com os objetivos mensais a serem alcançados e com as tarefas a ser desempenhadas por cada colaborador. No caso de haver algum problema, este também constava neste quadro, devendo ser acompanhado por possíveis formas de o ultrapassar. Outra medida implementada, mas não tão regular foi a realização de pequenas reuniões, onde o objetivo seria transmitir qualquer informação que fosse revelante, nomeadamente esclarecimentos sobre campanhas promocionais a decorrer e metas de vendas a atingir relativamente a algum produto ou medicamento não sujeito a receita médica (MNSRM).

A oportunidade de integrar uma equipa que se rege através desta metodologia permitiu não só melhorar a minha perceção sobre o modo como funciona os processos na farmácia, mas também acompanhar de forma regular quais os objetivos que iam sendo estipulados e alcançados.

3.2. PONTOS FRACOS

3.2.1. Dificuldade em associar o nome comercial à nomenclatura DCI

Esta dificuldade foi mais sentida no início do atendimento ao público, uma vez que durante o curso, usamos maioritariamente apenas a denominação comum internacional (DCI), em detrimento do nome comercial. Esta designação é a mais correta, uma vez que como profissionais de saúde, os farmacêuticos têm a obrigação de conhecer a molécula e o seu mecanismo de ação e não tanto o nome comercial, o qual é estabelecido pela empresa que o

desenvolve, como forma de o identificar como sendo sua propriedade, não tendo muitas das vezes qualquer ligação com a DCI.

Ao longo do meu estágio verifiquei que muitos dos utentes, referiam-se à sua medicação habitual pelo nome comercial, muitas das vezes sem saber qual o nome do princípio ativo do medicamento, sendo que muitos deles, também me questionavam se ainda tinham determinado medicamento por aviar na receita, através desse mesmo nome. Por estas razões, no princípio senti alguma dificuldade em fazer a associação entre nome comercial e DCI.

No entanto, com o decorrer do tempo, através do manuseamento e familiarização com os vários medicamentos e com recurso às potencialidades do SIFARMA 2000[®], esta dificuldade foi sendo ultrapassada. Saliento, também que a etapa inicial de arrumação e receção de medicamentos, ao permitir um maior contacto com as caixas, teve uma enorme contribuição para me adaptar e estabelecer esta associação, de forma mais gradual.

3.2.2. Dificuldade na Análise de Receitas Manuais

A presença de receitas manuais na farmácia tem vindo a diminuir significativamente nos últimos anos. Apesar desse facto, estas ainda podem ser prescritas, quando uma das seguintes situações acontece: falência informática, inadaptação do prescriptor, prescrição no domicílio ou até 40 receitas/mês. Apesar de terem caído em desuso, foram várias as situações em que me deparei com receitas manuais.

Alguns dos principais problemas associados a este tipo de receita são as especificações, a que esta tem de obedecer para serem consideradas válidas. Outro aspeto em que tive dificuldade foi na interpretação da caligrafia do médico, que nem sempre era totalmente perceptível. Assim, para evitar a ocorrência de potenciais erros, que fossem prejudiciais tanto para o utente, como para a farmácia, foi-nos pedido, para que confirmássemos sempre com um farmacêutico, antes da cedência do medicamento. Além disso foram também, várias as situações em que como as receitas não especificavam a dosagem ou tamanho da caixa, tive de ceder a dose mais baixa e/ou a embalagem mais pequena, algo que os utentes não compreendem, uma vez que por vezes a quantidade cedida não era suficiente para a duração de todo o tratamento.

Considero que estes aspetos foram um ponto fraco do meu estágio, porque tornaram constrangedoras algumas interações, visto que os utentes, não tem o conhecimento destas

regras, traduzindo-se por vezes num pensamento negativo, relativamente à competência do estagiário.

3.2.3. Inexperiência no Atendimento

Como é natural, no início do atendimento ao público sentia-me pouco à vontade e insegura, uma vez que não tinha experiência prévia, nem com o software informático e as suas funcionalidades, bem como a correta forma de comunicação com o utente. Algumas das situações que se destacam estão relacionadas com procedimentos, como a adição de regimes de complementaridade e de protocolos PSP, de alguns utentes, os quais muitas das vezes assumiam que já teríamos conhecimento prévio desta situação, por serem utentes habituais da farmácia.

O facto de não estar totalmente à vontade com o SIFARMA 2000® e todos os seus atalhos, na fase inicial traduziu-se num aumento do tempo do atendimento. No entanto, esta dificuldade foi colmatada ao longo do tempo de estágio. Algo que se deve ao aumento da experiência que advém de um maior número de atendimentos, como ao desenvolvimento das minhas capacidades de comunicação verbal e não verbal.

3.3. OPORTUNIDADES

3.3.1. Auditoria Interna

A Farmácia Luciano & Matos possui um Sistema de Gestão de Qualidade, suportado na Norma NP EN ISO 9001:2015, nas Boas Práticas de Farmácia e na restante legislação aplicável ao setor da Farmácia Comunitária, que tem em consideração uma abordagem por processos e o pensamento baseado no risco.

Para obtenção desta certificação, a farmácia é auditada duas vezes por ano, uma delas a auditoria interna, a qual precede a auditoria externa, realizada pela autoridade competente. A obtenção deste certificado é de extrema importância, pois transmite uma maior confiança aos utentes e estimula a existência de um plano organizacional estabelecido dentro na farmácia. Além disso demonstra ser uma forma de avaliar a eficácia do sistema implementado e de identificar oportunidades de melhoria contínua.

Assim, durante o meu estágio tive a oportunidade de estar presente na auditoria interna, a qual tem como principal objetivo, verificar se todos os processos se encontram em conformidade, funcionando assim como uma forma de preparação para a auditoria posterior. O acompanhamento e toda a preparação que antecedeu esta auditoria, proporcionou-me a oportunidade de contactar, bem de perto com o Manual da Qualidade da Farmácia Luciano & Matos, além de visualizar e aplicar na prática alguns dos conhecimentos que adquiri na faculdade, das quais destaco a unidade curricular de Gestão e Garantia de Qualidade.

3.3.2. Possibilidade de frequentar formações presenciais

Ao contrário de muitos dos nossos colegas, que nos anos anteriores não tiveram a oportunidade de estarem presentes em formações presenciais, este ano com o aliviar das restrições, houve a possibilidade de assistir a duas destas formações. Estas são orientadas por especialistas nas temáticas que se encontram em discussão e são dirigidas não só a farmacêuticos, mas também aos profissionais das mais variadas áreas da saúde.

Estas formações além de terem como objetivo darem a conhecer os benefícios de um medicamento ou suplemento, apresentam também geralmente uma componente inicial mais generalizada sobre o tema em questão, o que na minha perspetiva foi essencial para relembrar e aprofundar os conhecimentos que já tinha adquirido ao longo do curso e do estágio.

O tópico da primeira ação de formação que frequentei foi a contraceção oral de emergência, onde foi apresentado um novo medicamento disponível no mercado – Postinor ODIS. A segunda formação, à qual tive oportunidade de assistir teve como tema o envelhecimento com saúde, em que o suplemento em questão foi o Bioativo Q10. Ambas as formações tiveram inicialmente uma explicação detalhada e aprofundada, com incidência na farmacologia subjacente aos princípios ativos.

Assim considero que as formações externas à farmácia são fundamentais para que o farmacêutico esteja sempre atualizado, relativamente aos novos produtos, que estão constantemente a ser lançados no mercado. O facto de ter todas estas informações (benefícios e risco), permite ao profissional de saúde estabelecer ligações entre os vários produtos, permitindo posteriormente um aconselhamento individualizado e personalizado para cada situação e indivíduo.

3.3.3. Heterogeneidade dos utentes na farmácia

Como mencionado anteriormente, o facto de a Farmácia Luciano & Matos estar localizada no centro de Coimbra é ideal para que esta possua uma tipologia variada de utentes. De facto, a grande maioria das pessoas que iam à farmácia de forma regular eram utentes habituais, que têm a Farmácia Luciano & Matos como referência desde há anos, ou seja, que compram lá a sua medicação habitual.

No entanto, é também muito frequente surgirem turistas na farmácia. Aqui o atendimento baseia-se maioritariamente no aconselhamento de um produto ou de um MNSRM para uma determinada situação pontual. Estes contextos revelaram-se também uma mais-valia, pois permitiram a oportunidade de pôr em prática as minhas capacidades linguísticas, nomeadamente o inglês.

Assim, a oportunidade na diversidade de interações com os distintos tipos de utentes, ajudou-me a melhorar a minha capacidade de adaptação e versatilidade entre cada situação, traduzindo-se numa melhoria no ajuste da minha postura e capacidades comunicativas, consoante o contexto de cada atendimento.

3.4. AMEAÇAS

3.4.1. Testes covid-19 participados

Quando iniciei o meu estágio em janeiro, algumas semanas após as festividades, os testes participados ainda estavam no seu auge, o que fez com que houvesse uma grande afluência de pessoas na farmácia. Apesar de serem considerados algo de positivo para a farmácia, visto que eram muito lucrativos, na minha opinião, enquanto estagiária também se apresentaram como uma possível ameaça.

Na verdade, logo na primeira semana foi-me dada total autonomia para ajudar com as marcações e inscrições necessárias para a realização deste teste. De seguida fui também integrada em todo o processo que ocorre após a realização do teste, nomeadamente a inserção dos resultados na plataforma e a posterior faturação dos testes no SIFARMA 2000®. Esta interação tão precoce com o público foi deveras benéfica para as fases posteriores do estágio, como referido anteriormente.

No entanto, constatei que como desde muito cedo essa responsabilidade foi delegada quase inteiramente aos estagiários, fez com que houvesse situações em fases mais tardias, em que apesar de já termos capacidade de fazer atendimento e aconselhamento ao público e face a oportunidades de os fazer, foi-nos pedido para ajudar nessas tarefas.

Assim, acho que o nosso objetivo primordial de ganhar experiência e aplicar os nossos conhecimentos a situações práticas, sofreu por vezes um impacto negativo, em detrimento das tarefas que acompanham a realização dos testes, traduzindo-se conseqüentemente num papel menos ativo nos atendimentos.

3.4.2. Falta de confiança nos estagiários

Ao iniciar os atendimentos ao público deparei-me com algumas situações em que os utentes não sentiam confiança no estagiário, preferindo por isso aguardar o tempo necessário para que fossem atendidos por um colega com mais experiência. As principais razões de desconfiança estavam relacionadas com o facto de sermos jovens, e por isso com pouca experiência, o que do seu ponto de vista poderia refletir-se num alargamento do tempo de atendimento ou num possível erro, principalmente quando o medicamento em questão tinha de ser encomendado ou quando tinha de ser introduzido um regime de complementaridade. Também denotei que algumas vezes, durante o atendimento, normalmente quando se tratava de uma receita, alguns utentes preferiam perguntar a outro colega por algum conselho, em detrimento do estagiário. Neste caso específico, tinha a sensação, que o utente não confiava nos meus conhecimentos e capacidades em responder às questões que lhe surgiam.

Com o tempo, e aumento da convivência e familiarização para com os estagiários, denotou-se uma melhoria nesta desconfiança inicial. É de salientar que esta relação de proximidade entre estagiário e utente foi também conseguida, através da confiança que nos foi depositada pelos restantes membros da equipa, que por diversas vezes asseguravam os utentes das nossas capacidades e conhecimentos, de forma a prestar um bom aconselhamento e atendimento.

4. CONCLUSÃO

O estágio curricular em farmácia comunitária é uma etapa fundamental no percurso académico de qualquer estudante de Ciências Farmacêuticas. Esta experiência é deveras enriquecedora, para os futuros jovens farmacêuticos, pois permite não só consolidar, mas também colocar em prática os diversos conhecimentos e competências que são adquiridos ao longo destes 5 anos.

Esta oportunidade, na minha perspetiva foi também importante para perceber qual o papel e importância, que o farmacêutico comunitário desempenha no bem-estar da sociedade, destacando-se cada vez mais como um profissional de saúde a quem as pessoas recorrem para um aconselhamento individualizado, de confiança e com qualidade.

A Farmácia Luciano & Matos é um exemplo de excelência neste aspeto, salientando-se a sua visão, competitividade e aposta em serviços inovadores, com os quais pretende facilitar e acompanhar a adaptação dos utentes a novas terapêuticas e prestar o melhor auxílio e orientação a quem os procura.

De resto só tenho de agradecer o bom acolhimento e ótima disposição demonstrada por toda a equipa, a qual desde o princípio se mostrou inteiramente disponível, no esclarecimento de dúvidas e transmissão de conhecimento e ferramentas, que considero como sendo essenciais para o meu futuro profissional. Na minha opinião, é também essencial destacar a importância da confiança depositada por todos, nas minhas capacidades, a qual foi crucial para o meu desenvolvimento e desempenho em todos os processos subjacentes a um bom e correto funcionamento da farmácia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS. **A Farmácia Comunitária**. [Acedido a 15 de maio de 2022]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>
2. FARMÁCIA LUCIANO & MATOS. **Manual da Qualidade**. Rev. 2 (2022)
3. FÁRMACIA HOLON - **Quem Somos: missão, visão, valores e responsabilidade social**. [Acedido a 15 de maio de 2022]. Disponível em: <https://www.farmaciasholon.pt/quem-somos>
4. EZFY. **Quem Somos**. [Acedido a 16 de maio de 2022]. Disponível em: <https://www.ezfy.eu/quem-somos>
5. KAIZEN INSTITUTE - **Definição do KAIZEN™** (2022). [Acedido a 17 de maio de 2022]. Disponível em: <https://pt.kaizen.com/o-que-e-kaizen.html>
6. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Decreto-Lei n.º 95/2004, de 22 de Abril**. Lisboa: Diário da República n.º 95/2004- Série I-A (2004).
7. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS. **Norma específica sobre manipulação de medicamentos.(2018) I-9**. Disponível em: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/qualidade/of.c_n006_00_norma_especifica_sobre_manipulacayao_de_medicamentos_20991760195afd9cafc3f20.pdf
8. MINISTÉRIOS DA ECONOMIA E DA SAÚDE. **Portaria n.º 769/2004 de 1 de julho**. Lisboa: Diário da República n.º 153/2004 - Série I-B. (2004).
9. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS. **Preparação Individualizada de Medicação.(2018) I-21**. Disponível em.: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/norma_pim_vfinal_30_nge_00_010_02_1834827175bf58d479434f.pdf

ANEXOS

Anexo I - Casos Clínicos

Caso I

Uma senhora jovem, com cerca de 30 anos dirigiu-se à farmácia com o seu filho de poucos meses, com o intuito de ser aconselhada relativamente a produtos que pudesse usar durante o banho do mesmo. Isto porque o bebé apresentava a pele bastante sensível, com o desenvolvimento ocasional de zonas vermelhas, as quais estavam associadas a prurido. Com base nestas informações iniciais, coloquei-lhe algumas questões, de forma a perceber se poderia estar relacionado com um caso de dermatite atópica. No seguimento da conversa percebi que aquela situação era recorrente desde o nascimento do bebé e que havia casos de atopia na família. Estes fatores associados à observação do aspeto e localização destes eczemas, nomeadamente na face e nas articulações dos membros superiores, sugeriam que de facto poderia ser dermatite atópica. Assim, aconselhei a gama Lipikar da La Roche Posay, a qual foi desenvolvida para estas situações. De forma a ter uma rotina de banho adequada, recomendei o uso de um creme lavante, capaz de hidratar e aliviar a irritação, seguido da aplicação de um bálsamo hidratante, com capacidade de apaziguar a pele seca, para além de ajudar a espaçar as fases agudas e diminuir a severidades das crises. Nesta situação foi também importante fornecer outras informações que pudessem ser aplicadas na sua rotina diária, tais como, optar por um banho de curta duração, com água tépida; limpar a pele do bebé após o banho, com pequenos toques, ao invés de esfregar e ter preferência por roupa mais larga, de algodão. Em todo o caso, achei por bem indicar a utente a marcar uma consulta com o pediatra ou médico de família, se houvesse o agravamento da situação, de forma a que este pudesse lhe dar um diagnóstico concreto.

Caso II

Uma utente, com cerca de 25 anos deslocou-se à farmácia, sem receita médica, com o intuito de adquirir fosfomicina. Durante o atendimento, referiu que já tinha experienciado as queixas atuais no passado, e que após algum tempo e com o agravamento dos sintomas se tinha deslocado ao médico, onde lhe tinha sido prescrito este medicamento, para o tratamento de uma infeção urinária. Inicialmente, expliquei-lhe que a fosfomicina é um antibiótico, logo trata-

se de um medicamento sujeito a receita médica e que por esse motivo não podia dispensá-lo. No seguimento da conversa, a senhora referiu que o único sintoma que tinha de momento era ardor ao urinar, o qual tinha sido também uma das primeiras queixas no passado, antes do desenvolvimento da infeção urinária. Assim, como forma de aliviar o desconforto urinário e como possivelmente a infeção ainda não se encontraria instalada, ou seja, sem formação de um biofilme, sugeri a toma de Cistisil. Este suplemento alimentar constituído por fruto oligossacáridos, arando vermelho (*Vaccinium macrocarpon*), proantocianidinas, cavalinha (*Equisetum arvense*) e uva ursina (*Arctostaphylos uva-ursi*) é indicado para o desconforto urinário, associado a infeções urinárias ligeiras, contribuindo assim para o normal funcionamento da bexiga e trato urinário. Estes compostos são úteis tanto na prevenção de infeções urinárias, como previamente à formação do biofilme, pois inibem a adesão das bactérias, como a *Escherichia coli* às células do trato urinário. Para além desta sugestão, existem medidas não farmacológicas que se devem ter em conta, nomeadamente uma ingestão adequada diária de água, a utilização de produtos de higiene íntima adequados (mais acídicos) e evitar longos períodos de tempo sem urinar. De qualquer das formas, com o agravamento dos sintomas, é necessário a marcação de uma consulta com o médico de família, para que lhe possa ser prescrito uma terapêutica com antibióticos.

Caso III

Uma utente, de nacionalidade britânica com cerca de 25 anos deslocou-se à farmácia, com o intuito de obter aconselhamento, relativamente a uma irritação cutânea que tinha surgido nesse dia. A zona afetada (pé e zona acima do tornozelo) apresentava algumas manchas e lesões cutâneas, com prurido e rubor. Após uma atenta observação, percebi que esta era localizada, sugerindo que poderia ter origem no calçado. No seguimento da conversa, percebi que durante o dia, a senhora tinha calçado umas botas, acima do tornozelo, sem meias, que coincidia com a zona afetada. Este fator, associado ao facto de ter sido um dia de calor, durante o qual a utente tinha-se deslocado a pé durante vários quilómetros, sugeriam que pudesse ter sido uma alergia ou dermatite de contacto, com origem no calçado. Assim, após a obtenção de uma segunda opinião por outro farmacêutico, optei por ceder Fenegan. Este é um gel para aplicação tópica que contém um anti-histamínico na sua composição, a prometazina, indicado no tratamento de sintomas locais de alergias e irritações de pele, de etiologia variada, que deve ser aplicado 2x/dia. De forma a aliviar os sintomas mais rapidamente, aconselhei também

a toma oral de cetirizina, durante 2 a 3 dias. Como este fármaco é um antihistamínico de 1ª geração, que pode estar associado a sonolência, referi que a toma poderia ser ao jantar, não afetando assim a rotina diária da utente. Outras medidas não farmacológicas que achei importante referir foi a limpeza adequada da zona afetada antes da aplicação de uma camada fina do gel e optar por calçado arejado até haver uma melhoria visível da zona afetada.

Caso IV

Um senhor com cerca de 72 anos, polimedicado deslocou-se à farmácia, com queixas de obstipação, nomeadamente distensão e mal-estar abdominal, associados a flatulência. Durante a conversa referiu que estes sintomas eram frequentes e que procurava algo que aliviasse os mesmos. Como já tinha histórico na farmácia, optei por verificar a sua medicação habitual, uma vez que esta poderia estar relacionada com as queixas apresentadas. De facto, um dos fármacos que constavam na sua terapêutica era um antidepressivo tricíclico, o qual tem como possíveis efeitos secundários a constipação intestinal, podendo estar na origem destes sintomas. Neste caso, como se tratava de um utente fragilizado, com outras patologias concomitantes, das quais destaco a diabetes *mellitus* tipo 2, optei por ceder Dulcosoft Duo, o qual é composto por macrogol 4000 e simeticone. O macrogol é um laxante osmótico suave, que atua através da reidratação e amolecimento das fezes duras, sendo por isso importante uma ingestão regular de água, algo que destaquei na conversa com o utente. Aliado ao macrogol, ainda apresenta na sua constituição o simeticone, o qual ajuda a reduzir a sensação de inchaço, uma vez que ajuda na dispersão dos gases retidos no estômago e intestino. Outra razão pela qual aconselhei este medicamento foi pelo facto de este não conter açúcares na sua composição, sendo por isso seguro o seu uso em indivíduos diabéticos. Aliado ao Dulcosoft Duo, referi também algumas medidas não farmacológicas importantes no alívio da obstipação, como a ingestão regular de água (algo que a utente não fazia), a atividade física regular (pequena caminhada) e um aumento na dieta de alimentos ricos em fibra, como frutos e vegetais.

Caso Prático V

Um rapaz jovem, com cerca de 28 anos dirigiu-se à farmácia com queixas relativas a congestão nasal. Como o meu estágio decorreu durante a Primavera, era algo frequente o aparecimento

de utentes com os mesmos sintomas, associados à época sazonal e às alergias que aí advinham. No seguimento da conversa, o utente referiu que apresentava também “pingo do nariz”, isto é, rinorreia, além da congestão nasal. Desta forma, optei por ceder um spray nasal Vibrocil, de aplicação local. Dentro da marca, existem vários produtos, que diferem na sua composição. Para esta situação específica dei preferência à associação entre a fenilefrina, ou seja, um descongestionante nasal e o maleato de dimetindeno, o qual é um anti-histamínico, indicados para o tratamento da congestão nasal e rinorreia, associados a sintomas alérgicos. Também referi que a posologia indicada para adultos é de 1 a 2 nebulizações em cada narina, 3 a 4 vezes ao dia, e a duração do tratamento não deve ultrapassar 5 dias, devido à possibilidade de ocorrência de rinite medicamentosa com origem no uso prolongado do descongestionante nasal. Apesar de não estar associado a tantos efeitos secundários, como os medicamentos orais, a aplicação nasal pode estar associada a um desconforto, espirros, irritação e secura da mucosa nasal. Como complemento à terapêutica, aconselhei também algumas medidas não farmacológicas, como a lavagem nasal com água do mar hipertónica e a elevação da cabeceira da cama.

Anexo II: Resumo das Especificações Legais do Laboratório



CHECKLIST AUDITAR ESPECIFICAÇÕES LEGAIS DO LAB



Nº DESCRIÇÃO

LIVROS OBRIGATORIOS:

- 1 Farmacopeia Portuguesa – 9ª Edição, em CD-ROM, e respetivos suplementos (FP 9.0 - Edição Base; FP 9.4 - 4 Primeiros Suplementos; FP 9.5 - 5.º Suplemento; FP 9.6 - 6.º Suplemento; FP 9.7 - 7.º Suplemento; FP 9.8 - 8.º Suplemento)
- 2 Prontuário Terapêutico - 11.ª edição (2013), em papel ou formato eletrónico, acessível através do site do INFARMED (versões html, pdf e WebMobile)
- 3 Fichas de Preparação de Manipulados

IDENTIFICAÇÃO DE DOCUMENTOS:

- 1 Carimbos: com identificação da farmácia, do diretor técnico, morada da farmácia e contactos
- 2 Rótulos: com identificação da farmácia, do diretor técnico, morada da farmácia e informações requisitos constantes das boas práticas a observar na preparação de medicamentos manipulados em farmácia de oficina e hospitalar
- 3 Impressos - papel timbrado e envelopes: com identificação da farmácia, do diretor técnico, morada da farmácia e contactos (conveniente)

MATERIAL DE LABORATÓRIO OBRIGATÓRIO

- 1 Sistema de exaustão, câmara de evaporação ou nicho para a eliminação de fumos e gases
- 2 Local de lavagem de material com água corrente, por cima da bancada de manipulação
- 3 Balança de precisão sensível ao mg (marcação "CE")
- 4 Evidência de calibração anual da balança de precisão
- 5 Evidência de verificação metrológica da balança de precisão
- 6 Almofarizes de vidro e de porcelana
- 7 Banho de água termostaticado
- 8 Alçómetro
- 9 Cápsulas de porcelana
- 10 Pipetas graduadas (sugestão: 1 a 5 cc)
- 11 Copos de várias capacidades

- 12 Tamises FP VIII (com fundo e tampa): com a.m. 180µm e 355µm
- 13 Espátulas metálicas e não metálicas
- 14 Funis de vidros
- 15 Papel de filtro
- 16 Papel indicador do pH universal
- 17 Matrizes de várias capacidades
- 18 Pedra para a preparação de pomadas
- 19 Provetas graduadas de várias capacidades (25, 100, 250 cc)
- 20 Termómetro (escala mínima até 100°C)
- 21 Vidros de relógio

Sistemas de Conservação:

- 1 Local de preparação de medicamentos manipulados com sistema de registo de temperatura e humidade (termohigrómetros)
- 2 Evidência de calibração do termohigrómetro
- 3 Evidência de controlo semanal do termohigrómetro

Matérias Primas:

- 1 Fichas de dados de segurança (FDS)
- 2 Boletins analíticos das MP armazenadas (validados pelo DT - data, carimbo e rubrica)
- 3 Fichas de movimentação de MP (conveniente)
- 4 Zona segregada para colocação de MP de prazo de validade expirado (obrigatório) ou a expirar (facultativo)
- 5 Fichas de preparação de manipulados e rotulagem - manutenção durante 3 anos

Anexo III: Ficha de Preparação do Medicamento Manipulado

Medicamento: Suspensão oral de Espironolactona 2 mg/ml

Teor em substância(s) activa(s); 100g (ml ou unidades) contém 0,2 g (ml) de Espironolactona

Forma farmacêutica: Suspensão

Data de preparação: 26/4/2022

Número de lote: 202204139

Quantidade a preparar: 60 ml

Matérias-primas	Nº de lote	Origem	Farmacopeia	Quantidade para 100ml	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Rubrica operador	Rubrica supervisor
Espironolactona	220537	Acofazena	Ph.ve. 26	0,2 g	0,1206g	0,120(5)g	BRG	MY
SyrSpend® SF pH4 (ceceja)	2402158	Fageon	Fageon	q.b.p. 100ml	q.b.p. 60ml	61,2g	BRG	MY

Preparação

1. Verificar o estado de limpeza do material.	BRG
2. Pesar a espironolactona e transferir para almofariz de porcelana.	BRG
3. Adicionar uma pequena quantidade de SyrSpend® SF pH4, de modo a formar uma pasta homogénea. (Não esquecer de agitar o frasco de SyrSpend® SF pH4 antes de usar!)	BRG
4. Adicionar pequenas quantidades de SyrSpend® SF pH4 em porções geométricas, agitando após cada adição de forma de obter uma suspensão homogénea.	BRG
5. Transferir a suspensão para proveta rolhada.	BRG
6. Lavar o almofariz com pequenas quantidades de SyrSpend® SF pH4 com e juntar à proveta, até perfazer o volume de 60 ml.	BRG
7. Transferir para um frasco de vidro âmbar.	BRG
8. Fechar o frasco e rotular.	BRG
9. Lavar e secar o material utilizado.	BRG

Aparelhagem usada: Balança 0,01

Embalagem

Tipo de embalagem: Frasco de Vidro Âmbar

Material de embalagem	Nº de lote	Origem
Frasco vidro âmbar tipo III	020436-X-1	Acatozma
Tampa P28	27072-21	Taxe Mestre, SA

Capacidade do recipiente: 135 mL

Operador: 

Prazo de utilização e Condições de conservação

Condições de conservação: Conservar no frigorífico, num recipiente bem fechado, protegido de luz

Operador: 

Prazo de utilização: 30 dias

Operador: 

Rotulagem

1. Proceder à elaboração do rótulo de acordo com o modelo descrito em seguida.
2. Anexar a esta ficha de preparação uma cópia, rubricada e datada, do rótulo da embalagem dispensada.

Modelo de rótulo

Identificação da Farmácia Identificação do Director Técnico Endereço e telefone da Farmácia	DENOMINAÇÃO DO MEDICAMENTO	Identificação do Médico prescriptor Identificação do doente
Teor em substância(s) activa(s) Quantidade dispensada Referência a matérias-primas cujo conhecimento seja eventualmente necessário para a utilização conveniente do medicamento Posologia Via de administração		Data de preparação Prazo de utilização Condições de conservação Nº de lote Manter firma do almoxarife das crianças Advertências (precauções de manuseamento, etc.) Uso externo (caso se aplique) (em fundo vermelho)

Operador: 

Cálculo do preço de venda

MATÉRIAS-PRIMAS:

Materias-primas	Embalagem existente em armazém		Preço de aquisição de uma dada quantidade unitária (sem IVA)		Quantidade a usar	Factor multiplicativo	Preço da matéria-prima utilizada na preparação
	Quantidade adquirida	Preço de aquisição (€ IVA)	Quantidade unitária	preço			
Espironolactona	5 g	12,98 €	1g	2,596 €	x 0,1206	x 2,5	= 0,78 €
SyrSpand® ST pft	570g	30,42 €	1g	0,0534€	x 61,2	x 1,9	= 6,93 €
	570g	—					
	1) — x						
							Total Matéria-Prima (A) = 7,71 €

HONORÁRIOS DE MANIPULAÇÃO:

	Forma Farmacéutica	Quantidade	F (€)	Factor multiplicativo	Valor
Valor referente à quantidade base	Suspensões obtidas por manipulação de AP em 257 ml e 100 mg todos individualmente	60 ml	5,11 €	x 3	= 15,33 €
Valor adicional			x €	x	= €
					Total da Manipulação (B) = 15,33 €

MATERIAL DE EMBALAGEM:

Materiais de embalagem	Preço de aquisição	Quantidade	Factor multiplicativo	Valor
meio vial com tampão 1/5ml	0,38 €	x 1	x 1,2	= 0,46 €
tampa p28	-0,15 €	x 1	x 1,2	= -0,18 €
				Total de Material de Embalagem (C) = -0,64 €

P. V. P. DO MEDICAMENTO MANIPULADO:

Soma de (A) + (B) + (C)	Factor multiplicativo	Valor
23,68 €	x 1,3	= 30,784 €
		I. V. A. = 1,254 €
		(D) = 32,63 €

DISPOSITIVOS AUXILIARES DE ADMINISTRAÇÃO:

Dispositivo	Preço unitário	Quantidade	Valor
			(E)

PREÇO FINAL: (D+E) = 32,63 €

Operador: B.F.

Supervisor: [assinatura]

Anexo IV: Rótulo do Medicamento Manipulado

	Dir. Téc: Dra. Maria Helena Amado Praça 8 de Maio, 40-42 3000-300 Coimbra Telf: 239 822 147 Fax: 239 824 112
Suspensão Oral de ESPIRONOLACTONA 2 mg/ml	
<u>AGITAR BEM</u> <u>ANTES DE USAR</u>	
Posologia: Administrar segundo indicação médica (1 ml = 2 mg).	Quantidade: 60 ml
Utente: Franco	
Médico: Dr. Rui Sá	Contém aroma a cereja
1 ml contém 2 mg de espironolactona	VIA ORAL
Conservar no frigorífico, no frasco bem fechado.	Lote: 202204139
Data Prep.: 26-04-2022	Prazo utiliz.: 26-07-2022
Manter fora do alcance das crianças	

PARTE II

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

-Bluepharma[®]-

Estágio orientado pela
Dra. Cláudia Corker Arranja

ABREVIATURAS

CG – Cromatografia Gasosa

HPLC – do inglês, High Performance Liquid Chromatography

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

SOPs – do inglês Standard Operation Procedures

SWOT - do inglês Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats

I. INTRODUÇÃO

O plano de estudos relativo ao Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) destaca-se devido à sua abrangência e multidisciplinaridade. Ao longo destes 5 anos somos expostos a diferentes campos do conhecimento, os quais contribuem para a nossa preparação, enquanto profissionais de saúde, independentes e capazes de exercer a atividade farmacêutica, nos diferentes setores que a constituem.

Neste sentido, como complemento à nossa formação académica e de forma a colocar em prática os conhecimentos adquiridos, é nos dada a oportunidade de exercer um estágio de carácter facultativo, numa área da nossa escolha. Isto é possível através dos protocolos estabelecidos entre a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e variadas entidades externas. Esta oportunidade é uma mais-valia, na perspectiva em que permite termos um contacto mais próximo com outras realidades, que se constituem como uma possível saída profissional futura. Além disso, confere também uma vantagem adicional aquando da entrada no mercado de trabalho.

Posto isto, após um processo de candidatura e subsequente entrevista, fui selecionada para um estágio com duração de 3 meses na empresa farmacêutica Bluepharma®. Neste sentido, fiquei alocada à unidade analítica, mais precisamente ao suporte ao desenvolvimento de formulações, onde permaneci sob a orientação da Dr^a Cláudia Corker Arranja. Dada esta oportunidade que me foi concedida, foi com grande entusiasmo que iniciei esta nova jornada neste estágio.

Assim, o presente relatório está estruturado sob a forma de uma análise SWOT, no qual pretendo de uma forma crítica e construtiva abordar diferentes aspetos do estágio que realizei, com principal destaque nos pontos fortes e fracos, a nível interno e nas oportunidades e ameaças externas.

2. BLUEPHARMA

A Bluepharma® é uma empresa farmacêutica, de capitais portugueses, sediada em São Martinho de Bispo, em Coimbra. A sua atividade e crescimento reside em toda a cadeia de valor do medicamento, no entanto pode-se destacar três distintas categorias. São elas a produção de medicamentos próprios e genéricos, a investigação, desenvolvimento e registo de medicamentos e a comercialização de medicamentos genéricos, maioritariamente destinados à exportação.

A empresa iniciou a sua atividade em meados de 2001, após a aquisição das instalações industriais, pertencentes à grande multinacional alemã Bayer. Com mais de 20 anos de experiência neste setor, a empresa foi atingindo marcos importantes, os quais contribuíram imensamente para o prestígio alcançado não só no mercado nacional, mas também nos mais exigentes mercados internacionais.

A principal missão do grupo é a aposta na inovação de medicamentos, nomeadamente no desenvolvimento de fármacos potentes, sempre aliado a uma melhoria contínua na qualidade e inovação dos processos usados no seu respetivo fabrico e comercialização. Para que isso seja possível, a política da empresa baseia-se em três pilares fundamentais: investimento, inovação e internacionalização, os quais encontram-se interligados ao estabelecimento de parcerias e a um foco permanente na qualidade.

Assim, com o intuito de expandir e diversificar o negócio, o grupo tem apostado na inovação, como é o caso do lançamento de embalagens de medicamentos com sistemas de cores para daltónicos, tendo também em vista novos projetos, dos quais se destacam a produção de injetáveis complexos e num futuro ainda mais próximo o projeto Bluepharma Acelera 2030. Com este grande investimento pretende-se a criação de uma nova unidade industrial, localizada em Eiras, equipada com a melhor tecnologia de ponta, destinada à investigação, desenvolvimento e produção de formas sólidas orais potentes.

3. ANÁLISE SWOT

PONTOS FORTES	PONTOS FRACOS
<ul style="list-style-type: none">• Receção, acolhimento e integração• Equipa e ambiente de trabalho• Formações Internas• Plano de Estágio• Contacto com diversos equipamentos• Metodologia KAIZEN	<ul style="list-style-type: none">• Conhecimentos sobre o manuseamento de equipamentos laboratoriais• Falta de conhecimentos sobre o software Waters Empower™
OPORTUNIDADES	AMEAÇAS
<ul style="list-style-type: none">• Processo de admissão• Experiência em Indústria Farmacêutica• Aprofundamento da componente laboratorial• Desenvolvimento de <i>soft skills</i>	<ul style="list-style-type: none">• Reconhecimento de estágio curricular em Indústria Farmacêutica

3.1. PONTOS FORTES

3.1.1. Receção, acolhimento e integração

O meu estágio iniciou-se no dia 2 de maio com uma receção presencial na sede da Bluepharma®, levada a cabo pelo departamento dos recursos humanos. Durante esta sessão em sala, fomos integrados na história da Bluepharma®, nomeadamente na sua origem e em alguns marcos importantes na sua evolução ao longo dos últimos 20 anos. Durante a apresentação também nos foi explicado a forma como a empresa se encontra organizada e estruturada nos diferentes departamentos e respetivas funções, bem como as principais iniciativas e projetos que se encontram a ser desenvolvidos pelo grupo. Ficou também bem evidente que o espírito de equipa é algo muito apreciado e valorizado dentro na empresa. Assim, de forma a fomentar o cooperativismo e colaboração entre os diferentes departamentos, a administração aposta na realização anual de um convívio, repleto de atividades *team building*.

Após esta receção, no âmbito do “Programa de Tutores” foi atribuído a cada estagiário um tutor, ou seja, um colaborador experiente, responsável por nos ajudar no processo inicial de adaptação. Neste primeiro dia, a minha tutora deu-me a conhecer as instalações, com as quais iria contactar diariamente e dirigiu-me aos locais destinados ao levantamento de todo o material necessário à realização de estágio, nomeadamente equipamentos de proteção individual e material informático.

Tendo tudo isto em consideração, é de louvar o grau de preparação e disponibilidade por parte da empresa relativo à receção e integração dos estagiários, sendo que desde o primeiro dia me senti bem acolhida por todos os membros da mesma.

3.1.2. Equipa e ambiente de trabalho

Um dos pontos chave que estão na base do sucesso e crescimento de qualquer empresa são os seus colaboradores. A Bluepharma®, não é nenhuma exceção à regra, uma vez que se distingue pela procura constante de profissionais com qualidade, focados e dotados das competências necessárias para o desempenho das suas funções.

O departamento de suporte ao desenvolvimento de formulações é constituído maioritariamente por uma equipa jovem, profissional e altamente qualificada. Estas vertentes profissionais são transversais a toda a empresa, no entanto algo que se destacou, talvez devido ao maior contacto que tive com este grupo foi o espírito de companheirismo e entajuda existente entre todos os membros que o compõe.

A minha integração na equipa correu conforme as minhas expectativas, tendo também sido facilitada pela boa disposição e informalidade presentes no ambiente de trabalho. Desde o início do meu estágio, todos os colegas demonstraram uma grande abertura e disponibilidade, tanto para explicar todos os procedimentos inerentes às análises realizadas pelo departamento, como para o esclarecimento de qualquer dúvida que pudesse ter. O facto de me tratarem como igual, foi também um fator que contribuiu para que me sentisse acolhida e à vontade para colocar todas as minhas dúvidas e questões, que surgissem durante o desempenho das minhas tarefas.

3.1.3. Formações Internas

A formação interna dos colaboradores é uma das grandes apostas da Bluepharma®, como forma de garantir que estes apresentam todas as valências e competências necessárias para a realização, com a máxima qualidade das respetivas tarefas.

Inicialmente, estas formações são de carácter geral, tendo como principal objetivo a integração dos novos colaboradores, nomeadamente no âmbito das políticas internas da empresa e nas atividades desenvolvidas pela mesma. Simultaneamente, tem também a intenção de esclarecer, desde cedo algumas medidas e normas de orientação relativas à segurança e práticas

laboratoriais. Cada um destes módulos consistia numa apresentação sob a forma de vídeo, seguida da devida avaliação, a qual estava sujeita a aprovação.

Aliado a estas formações iniciais, estava também a leitura obrigatória de *standard operating procedures* (SOPs) dirigidas às funções que iria desempenhar durante o período de estágio. Esta leitura permitiu uma familiarização com conceitos usados diariamente na empresa. Ao longo do estágio fomos também convocados para formações mais específicas para cada departamento, via Teams ou em alguns casos em sala, algumas delas também sujeitas a posterior questionário. Na minha perspetiva, estas são cruciais para a consolidação de conhecimento que fui adquirindo tanto pelo acompanhamento como na prática das diferentes análises, com destaque para a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Este foi assim, um dos pontos positivos do meu estágio, uma vez que facilitou a minha integração nos processos de funcionamento da Bluepharma®, bem como providenciou-me conhecimentos úteis de aplicação laboratorial, que me foram extremamente úteis para a compreensão e execução de determinadas análises e que com toda a certeza terão impacto no meu percurso profissional, caso ingresse na indústria farmacêutica.

3.1.4. Plano de Estágio

O início do estágio na Bluepharma®, como referido anteriormente, engloba a visualização das formações, que constam na plataforma *Success Factors*, a maioria delas sujeitas a posterior apreciação e à leitura das SOPs, necessárias para as funções que iremos desempenhar dentro de cada departamento.

Após a realização destas tarefas, fui também introduzida na componente laboratorial, através do acompanhamento de uma analista pertencente ao departamento, a que fui alocada. Nesta fase, tive a oportunidade de consolidar e aprofundar os conhecimentos previamente adquiridos ao longo do curso, com particular destaque à análise de HPLC.

Após 1 mês, a acompanhar e auxiliar nas análises de HPLC, tive também a oportunidade de estar um período limitado de tempo nos cálculos automáticos. O objetivo destes cálculos é facilitar, através da programação dos diversos projetos existentes na empresa, o trabalho realizado pelos analistas, na análise dos resultados. Complementarmente, ajuda também a evitar possíveis erros que possam surgir aquando o preenchimento da folha de cálculo, uniformizando assim os resultados obtidos nas diversas análises efetuadas. A minha

intervenção foi a nível da validação cruzada, ou seja, na comparação dos resultados obtidos no *report* das análises efetuadas através de cálculos automáticos, com os cálculos obtidos através do preenchimento manual da folha de cálculo.

Na porção final do meu estágio, tive ainda a oportunidade de aprender e realizar algumas análises de amostras pela técnica de *Karl Fisher*, através da qual se pretende obter o teor de água existente na amostra testada. Além disso, estive também muito brevemente a acompanhar as análises de complexos injetáveis, nomeadamente no que diz respeito à análise de solventes residuais, por cromatografia gasosa (CG) e à análise do tamanho de partículas, por *particle size distribution*.

3.1.5. Contacto com os diversos equipamentos

Ao longo do estágio, foram diversas as análises que pude acompanhar. Uma das análises com mais expressão em todo o departamento é a análise por HPLC, a qual é frequentemente usada na identificação e quantificação do conteúdo de princípio ativo numa amostra, impurezas e como método de quantificação de dissoluções.

Esta técnica permite a separação dos componentes numa amostra, com base na afinidade das moléculas para com a fase móvel líquida e a fase estacionária (coluna cromatográfica) utilizadas neste processo. A saída do composto da coluna cromatográfica é detetada pelo detetor, que processa esta informação e a traduz numa representação gráfica, o cromatograma. Nesta etapa, consegui contactar com as diferentes marcas (Waters e Shimadzu) e modelos existentes deste equipamento e perceber de que modo diferem entre si, nomeadamente a nível da construção e do respetivo funcionamento. Após a corrida das amostras, foi-me também explicado, de forma simplificada o software Empower, a partir do qual são obtidos e analisados os resultados.

Durante os três meses, tive também contacto com outros equipamentos, como é o caso do equipamento de cromatografia gasosa da marca Perkin Elmer, cujo fundamento é similar ao HPLC, com a exceção da fase móvel ser gasosa e o equipamento de *particle size distribution* (MasterSizer), cujo princípio baseia-se na difração da luz.

Considero que os conhecimentos que adquiri em disciplinas como Métodos de Instrumento de Análise e Tecnologia Farmacêutica, mostraram-se fundamentais para a compreensão mais profunda desta análise e de todos os parâmetros que são avaliados durante a mesma.

3.1.6. Metodologia KAIZEN

A Bluepharma® destaca-se como sendo uma grande empresa farmacêutica. Devido à sua dimensão é necessário ter uma estrutura e organização adequadas, que permitam a competitividade da empresa no mercado a longo prazo. Para este efeito, existem diversas estratégias que são aplicadas. Uma delas, que abrange todos os colaboradores são a realização de reuniões KAIZEN. Esta terminologia, de origem japonesa, quando aplicada em contexto de trabalho significa melhoria contínua, tanto de todos os colaboradores, como por parte da administração. Esta ideologia tem como principais objetivos o conhecimento e criação de valor para o cliente, otimização dos processos e eliminação das ações que não acrescentam valor à empresa e capacitação das pessoas, através da definição de objetivos concretos e atingíveis.

Como referido anteriormente, uma forma prática de aplicar esta metodologia é a realização de pequenas reuniões diárias, com uma duração aproximada de 15 minutos. Estas têm como propósito reunir toda a equipa, a qual encontra-se dividida em dois turnos, para debater as tarefas realizadas por cada colaborador ao longo do seu dia de trabalho. Têm também o intuito de expor potenciais problemas e sugerir possíveis resoluções para os mesmos. De modo geral é uma oportunidade, para haver a partilha de ideias, opiniões e conhecimentos entre toda a equipa.

A meu ver, o facto de estar envolvida nestas reuniões desde o primeiro dia, além de contribuir para facilitar a minha adaptação dentro da equipa, ajudou-me a compreender e interiorizar conceitos fundamentais para a realização das tarefas do departamento.

3.2. PONTOS FRACOS

3.2.1. Conhecimentos sobre o manuseamento de equipamentos laboratoriais

O MICF é um curso que considero como sendo bastante abrangente e versátil, na medida em que permite a ação do farmacêutico em diferentes áreas de trabalho. Durante os 5 anos, somos expostos a diversas unidades curriculares de diferentes áreas, o que é uma enorme vantagem, aquando da entrada no mercado de trabalho.

No entanto, isto pode também refletir-se como sendo um ponto fraco, uma vez que não existe tempo para aprofundar as temáticas, sendo estas exploradas de forma generalizada. Um exemplo concreto é a unidade curricular de Métodos de Instrumento de Análise, a qual a meu ver para além de ser precoce no plano curricular, integra conceitos deveras importantes para

quem procura ingressar num departamento analítico, neste caso em específico da indústria farmacêutica. Assim, seria importante aprofundar conhecimentos teóricos e laboratoriais que são ativamente aplicados na indústria, como é o caso de HPLC e CG. Tal facto, aliado à pandemia, que impediu o regime presencial das aulas, e conseqüentemente a prática laboratorial, refletiu-se em algumas dificuldades a nível do manuseamento destes equipamentos e na resolução de problemas e questões relacionadas com os mesmos. Apesar disto, a aposta na formação dos colaboradores, por parte da empresa e o acompanhamento dos analistas permitiu ao longo do estágio colmatar estas dificuldades iniciais.

3.2.2. Falta de conhecimentos sobre o software Waters Empower™

A HPLC é uma das análises com maior expressão no suporte ao desenvolvimento de formulações. Para que seja possível a realização desta técnica é necessário um *software* que faça a interligação com o equipamento e que permita a análise posterior dos cromatogramas gerados. Na Bluepharma®, o *software* em utilização é o Waters Empower™. Este é um *software* de dados de cromatografia, adotado pela Bluepharma® face às exigências impostas pela autoridade americana, que permite a aquisição, gerenciamento, processamento, relatórios e distribuição de dados avançados.

Durante o estágio tive a possibilidade de contactar algumas vezes com o Empower, através da visualização do trabalho dos analistas. Apesar de ser razoavelmente fácil interiorizar algumas funcionalidades do programa, são várias as opções que podem ser aplicadas na análise dos resultados. Devido às multifuncionalidades do *software* e ao facto de não ter tido a oportunidade de interagir pessoalmente com o mesmo, tive algumas dificuldades em entender todo o processo envolvente na integração dos picos dos cromatogramas, através do qual são obtidos os parâmetros que são necessários analisar. Outros fatores que contribuíram para este aspeto, foi o facto de a maioria dos métodos de processamento estarem previamente criados e a inexistência de formações sobre este tópico.

3.3. OPORTUNIDADES

3.3.1. Processo de admissão

O processo de seleção da Bluepharma® é algo que se destaca, em comparação com muitos outros estágios. A candidatura a um estágio curricular na empresa engloba o envio prévio do

Curriculum Vitae e a escolha na preferência no departamento de ingresso. Após uma análise cuidada de todas as candidaturas, o processo avança para a condução de entrevistas presenciais, onde estão presentes os responsáveis dos departamentos disponíveis para aceitar estagiários, com especial atenção às nossas preferências. Durante a minha entrevista foram colocadas questões relativas ao meu percurso pessoal e académico, nomeadamente as características que possuía e que poderiam ser aplicadas durante o estágio e as razões que influenciaram a minha escolha de departamento.

Na minha perspectiva todo este processo é uma mais valia. Primeiramente, porque mostra que a Bluepharma® não valoriza apenas a média curricular, mas também outros fatores, igualmente importantes, tanto a nível pessoal como académico. E também, porque a existência de uma entrevista, funciona de certa forma como uma preparação futura, visto que esta é essencial para ingressar com sucesso numa atividade profissional. Assim, considero que todo este processo de admissão se constitui como uma oportunidade, uma vez que permitiu-me contactar um pouco com a realidade profissional, após a conclusão do curso.

2.3.2. Experiência em Indústria Farmacêutica

A indústria farmacêutica foi durante todo o meu percurso académico uma área atrativa, destacando-se como uma forte possibilidade de saída profissional futura. Esta curiosidade inicial, conjuntamente com o facto de ser uma área em constante crescimento, traduziu-se na minha vontade de realizar um estágio nesta área. Assim, quando esta oportunidade me foi apresentada, decidi de imediato candidatar-me.

Esta experiência permitiu-me, ainda que de forma geral, ter um contacto próximo com a realidade de trabalho e formar uma ideia concreta das aptidões necessárias para o exercício da função farmacêutica nesta área. Apesar de ter estado numa vertente mais laboratorial, percebi também que são vários os departamentos, em que o farmacêutico pode atuar, o que é um aspeto deveras positivo da nossa formação.

3.3.3. Aprofundamento da componente laboratorial

Os últimos dois anos do MICE foram pautados por um misto de dois regimes (online e presencial), algo que foi desvantajoso do ponto de vista da prática laboratorial, a qual ficou bastante condicionada. No entanto este estágio foi a oportunidade ideal para melhorar e

ganhar alguma destreza nesta vertente. Na parte inicial do estágio, em que estive a acompanhar a análise por HPLC dos sólidos, foi-me dada oportunidade de preparar algumas fases móveis, padrões e amostras. Nesta fase pude realizar algumas tarefas básicas, mas importantes, como a pesagem dos princípios ativos, diluições, entre outras. Neste contexto, tive também a possibilidade de executar outras análises com total autonomia, como foi o caso da avaliação do teor de água de amostras por Karl-Fisher e testes de desintegração de comprimidos. Assim, valorizo além de todas as técnicas e conhecimento que me foi transmitido durante o estágio, a confiança depositada nas minhas capacidades, pelos diversos analistas que tive oportunidade de acompanhar, pois com toda a certeza será uma grande vantagem competitiva para o meu futuro trajeto profissional.

3.3.4. Desenvolvimento de *soft skills*

Para se ser bem-sucedido no mercado de trabalho atual, é necessário o aperfeiçoamento de capacidades e aptidões, que nos permitam sobressair, em relação aos nossos pares. Neste aspeto, o estágio contribuiu para desenvolver algumas *soft skills*, que poderão ser aplicadas em várias áreas, das quais destaco o programa Excel.

Como referido anteriormente, estive durante cerca de um mês, a auxiliar nos cálculos automáticos, com particular destaque na validação cruzada. Nesta situação, fiquei responsável pelo preenchimento de folhas de cálculo, no programa Excel. O objetivo principal, era cruzar os resultados obtidos de forma manual, com os gerados através dos cálculos automáticos. Esta tarefa foi útil em vários aspetos, uma vez que além de me permitir ganhar alguma destreza e experiência com as diversas funcionalidades do Excel, serviu também para compreender a forma como é avaliada a calibração de diferentes projetos.

3.4. AMEAÇAS

3.4.1. Reconhecimento de estágio curricular em Indústria Farmacêutica

A obtenção do título de farmacêutico, exige complementarmente aos 5 anos de formação, a realização de um estágio curricular em farmácia comunitária ou hospitalar. Isto significa que o estágio em indústria farmacêutica não se encontra contemplado nesta lista, daí a exigência do cumprimento das 810h em farmácia comunitária, aos estudantes que optam por esta escolha. Este fator, aliado à necessidade da realização simultânea da monografia e dos respetivos relatórios de estágio, obriga a uma elevada organização, a nível da gestão de tempo e equilíbrio

da carga horária por parte dos estudantes, de forma a rentabilizar o tempo da melhor forma possível.

4. CONCLUSÃO

Primeiramente, a oportunidade de realizar um estágio na Indústria Farmacêutica, nomeadamente numa empresa como a Bluepharma® destaca-se como sendo uma mais-valia, no percurso académico de qualquer estudante com aspirações de exercer a sua atividade profissional nesta área.

Assim, considero que estes três meses, apesar não serem suficientes para compreender todos os processos inerentes ao bom e correto funcionamento da organização, permitiram-me aprender, relembrar e aplicar na prática alguns dos conhecimentos que fui adquirindo ao longo do curso. No meu caso, como estive alocada ao departamento analítico, esta foi também uma forma de adquirir experiência em algumas técnicas laboratoriais, que se encontram presentes na maioria das indústrias farmacêuticas.

Este estágio, apesar de ser maioritariamente focado na componente laboratorial foi também uma forma de expandir o meu conhecimento, relativamente ao contributo e à atividade que pode ser desenvolvida pelo farmacêutico nos diversos departamentos que compõe a empresa.

Só me resta agradecer a toda a equipa, que desde o primeiro dia me colocaram totalmente confortável e à vontade, facilitando assim a minha integração e desempenho ao longo do estágio. Desde o início demonstraram total abertura para responder a quaisquer dúvidas e perguntas que tivesse, o que contribuiu imensamente para a compreensão e consolidação dos conhecimentos adquiridos. De realçar também o excelente trabalho desenvolvido pela empresa, relativamente à disponibilidade demonstrada, na aceitação de diversos estagiários, apostando sempre nas suas capacidades, conhecimento e formação, de forma a moldar-nos nos melhores profissionais possíveis.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BLUEPHARMA – **História**. (2020). [Acedido a 10 de julho de 2022]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/about-history.php>
2. BLUEPHARMA – **Grupo Bluepharma**. (2020). [Acedido a 10 de julho de 2022]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/about-bluepharmagroup.php>
3. BLUEPHARMA – **Quem somos**. (2020). [Acedido a 4 de julho de 2021]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/about-us.php>
4. BLUEPHARMA – **Missão, Visão e Valores**. (2020). [Acedido a 7 de julho de 2021]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/about-mvv.php>
5. BLUEPHARMA GENÉRICOS - **Bluepharma é a primeira farmacêutica do mundo a lançar embalagens de medicamentos para daltónicos** [Acedido a 22 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.bluepharmagenericos.pt/Noticia/257/bluepharma-e-aprimeira-farmaceutica-do-mundo-a-lancar-embalagens-de-medicamentos-para-daltonicos>
6. BLUEPHARMA – **Bluepharma Acelera 2030 | Projeto 42.611**. (2020). [Acedido a 15 de julho de 2022]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/P2020-Acelera2030.php>
7. KAIZEN INSTITUTE – **What is KAIZEN™** (2022). [Acedido a 15 de julho de 2022]. Disponível em: <https://www.kaizen.com/what-is-kaizen.html>
8. BLUEPHARMA - **Desenvolvimento Galénico & Analítico**. [Acedido a 15 de junho de 2022]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/innovation/development.php>
9. UNIVERSIDADE DE COIMBRA - **Despacho n.º 11765/2018, de 7 de dezembro**. [Acedido a 17 de julho de 2022]. Disponível em: <https://dre.pt/application/conteudo/117279378>

PARTE III

Monografia

“O Papel do RNA na Biologia Sintética: processos de síntese e controlo de RNA e o Uso na Terapêutica”

-

Estágio orientado pelo
Professor Doutor Sérgio Paulo Magalhães Simões

ABSTRACT

Synthetic biology is a field of science, which encompasses different areas of knowledge, with the aim of redesigning microorganisms for biotechnological applications. Although this term has been known since the beginning of the 20th century, it was only during the last decades that it gained particular prominence, which was due to the recognition of the importance of the RNA molecule in the organism.

The versatility of the RNA molecule emerged with the discovery of regulatory RNA, that is, non-coding RNA, and the way in which it influences the homeostasis of the organism, resulted in a commitment and investment in the production of sophisticated programmable biological systems and new therapies. based on this molecule.

Non-coding RNA can be divided into different categories. However, this monograph focuses mainly on interfering RNA, namely microRNA and siRNA, which are important in gene regulation. Recently, these have been investigated as a potential class of new therapeutic agents, with application in a wide range of infectious diseases and in oncology. Although these two molecules share some similarities, namely in terms of structure and function, they present some differences, with regard to clinical application and the respective mechanisms of action. Thus, these characteristics, as well as the physicochemical properties and delivery strategy of these molecules to target cells, will be discussed throughout the paper.

Currently, another major application of RNA is in the development of vaccines based on messenger RNA, which have experienced exponential growth due to the speed with which they were developed and approved for the prevention of SARS-COV-2. The delivery of the various types of RNA previously mentioned in the cells is one of the main obstacles of this technology. Hence the importance of implementing nanotechnology, namely lipid nanoparticles, which, among other factors, allow to encapsulate nucleic acids, providing them with protection, which subsequently translates into an increase in bioavailability.

Keywords: synthetic biology, RNA, non coding RNA, siRNA, miRNA, mRNA vaccines, nanotechnology, lipid nanoparticles

RESUMO

A biologia sintética é um campo da ciência, que engloba diferentes áreas do conhecimento, com o objetivo de redesenhar microrganismos para aplicações biotecnológicas. Apesar deste termo já ser conhecido desde o início do século XX, foi apenas durante as últimas décadas, que ganhou particular destaque, o qual deveu-se ao reconhecimento da importância da molécula de RNA no organismo.

A versatilidade da molécula de RNA surgiu com a descoberta do RNA regulatório, ou seja, o RNA não codificante e no modo como este influencia a homeostase do organismo, traduziu-se numa aposta e investimento na produção de sofisticados sistemas biológicos programáveis e de novas terapêuticas, com base nesta molécula.

O RNA não codificante pode ser dividido em diferentes categorias. No entanto, esta monografia tem como principal foco o RNA de interferência, designadamente o microRNA e o siRNA, importantes na regulação genética. Recentemente, estes tem vindo a ser investigados como uma potencial classe de novos agentes terapêuticos, com a aplicação numa ampla gama de doenças infecciosas e na área oncológica. Apesar destas duas moléculas compartilharem algumas semelhanças, nomeadamente a nível da estrutura e função, estas apresentam algumas diferenças, no que diz respeito à aplicação clínica e nos respetivos mecanismos de ação. Assim, estas características, bem como as propriedades físico-químicas e estratégia de entrega destas moléculas nas células alvo, vão ser discutidas ao longo do trabalho.

Atualmente, outra grande aplicação do RNA é no desenvolvimento de vacinas baseada em RNA mensageiro, as quais foram alvo de um crescimento exponencial devido à rapidez com que foram desenvolvidas e aprovadas para a prevenção de SARS-COV-2. A entrega dos vários tipos de RNA mencionados nas células é um dos principais obstáculos desta tecnologia. Daí a importância da implementação da nanotecnologia, nomeadamente das nanopartículas lipídicas, as quais permitem, entre outros fatores encapsular os ácidos nucleicos, conferindo-lhes proteção, o que se traduz posteriormente num aumento da biodisponibilidade.

Palavras-Chave: biologia sintética, RNA, RNA não codificante, siRNA, miRNA, vacinas de mRNA, nanotecnologia, nanopartículas lipídicas

ABREVIATURAS

AGO2 - argonauta 2

antimiRs - oligonucleótidos anti-miRNA

ApoE - Apolipoproteína E

ASOs - oligonucleótidos antisense

ATTRh - amiloidose hereditária mediada por transtirretina

DGCR8 - DiGeorge Syndrome Chromosome Region

DLin-MC3-DMA - (6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl-4-(dimethylamino) butanoate

DNA - ácido desoxirribonucleico

DSPC - distearoilfosfatidilcolina

dsRNA - RNA em cadeia dupla

iRNA - RNA de interferência

lncRNA- *long non coding* RNA

LPNs - nanopartículas lipídicas

miRNA - microRNA

mRNA - RNA mensageiro

ncRNA - RNA não codificante

oncomiRs - microRNAs oncogénicos

ORF - open reading frame

PEG - polietilenoglicol

PEG2000-C-DMG - (R)-methoxy-PEG2000-carbamoyl-di-O-myristyl-snglyceride

pKa - constante de dissociação ácida

PRR - recetores de reconhecimento de padrões

RISC - complexo silenciador induzido por RNA

RNA - ácido ribonucleico

saRNA- *self-amplifying* RNA

siRNA - pequeno RNA de interferência

sncRNA - *small non coding* RNA

TLR - recetores Toll-Like

TRBP - *transactivation responsive RNA binding protein*

UTR - untranslated region

INTRODUÇÃO

No mundo em que vivemos existe a necessidade de estarmos constantemente preparados para a ocorrência de acontecimentos inesperados, como é o exemplo de uma pandemia ou uma epidemia. Tal facto, apresenta atualmente uma enorme importância, como nos fomos apercebendo durante estes últimos anos. Assim sendo, é essencial que haja uma constante inovação, relativamente a novas formas de diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças. A falta de novos desenvolvimentos tecnológicos e científicos ou a baixa velocidade de inovação em áreas como a medicina, a indústria farmacêutica, a biologia e a engenharia, pode refletir-se, tanto na qualidade de vida da população, como na vertente económica de uma sociedade. Para que estes avanços constantes sejam possíveis é obrigatório um uso metódico, coordenado e eficiente de uma quantidade cada vez maior, de dados e técnicas de bioengenharia, de forma a potencializar ao máximo a capacidade de resposta e de preparação para futuras ameaças à saúde humana¹.

Os princípios filosóficos e experimentais da biologia sintética surgiram primeiramente em 1911, através dos estudos desenvolvidos pelo biofísico francês Stéphane Leduc. Esta foi inicialmente fundada como sendo uma disciplina biofísica, que procurava explicações para a origem da vida, baseados em princípios físicos e químicos primitivos. Ao longo do século XX, houve diversas contribuições para esta área, das quais se destacam a descoberta do código genético e o estabelecimento do paradigma central da biologia molecular. A nova era da biologia sintética surgiu no início dos anos 70, com a invenção da tecnologia do DNA recombinante².

A biologia sintética moderna pode então ser definida como um campo da ciência que envolve o *design* e a construção de novas peças, dispositivos e sistemas biológicos. Concomitantemente, proporciona abordagens revolucionárias para a reutilização de sistemas e organismos biológicos naturais previamente existentes, conferindo-lhes finalidades úteis e novas competências³, as quais apresentam o potencial para serem aplicadas em soluções que permitam ultrapassar diversos desafios globais, nomeadamente em áreas como a sustentabilidade, o ambiente e a medicina⁴.

Inicialmente, a maioria dos esforços empregues nesta área foram baseados na engenharia genética, através da interação entre DNA e proteína, sendo o RNA apenas considerado como um intermediário neste processo. Com a evolução na área da pesquisa genética, foi

descoberto que a molécula de RNA desempenha também um papel significativo na regulação direta do comportamento celular⁵.

O RNA é considerado uma molécula versátil, pois apresenta a capacidade de detetar e interagir com pequenas moléculas, proteínas e outros ácidos nucleicos, enquanto codifica a informação genética necessária para a respetiva tradução em proteínas⁵. Isto é possível através do seu comportamento específico e sofisticado, alcançado através da sua flexibilidade estrutural e capacidade em adotar estruturas complexas, as quais desempenham funcionalidades específicas e singulares no organismo^{5,6}.

I. RNA NÃO CODIFICANTE: RNA REGULATÓRIO

O RNA é uma molécula conhecida pelos cientistas desde o início do século XIX, no entanto a sua importância para o funcionamento das células, foi durante muitos anos ofuscada pela importância dada ao DNA e às proteínas. Foi apenas durante os anos 50 do século passado, com a descoberta da estrutura molecular de dupla hélice do DNA por Watson e Crick, que foi proposto o dogma central da biologia molecular, no qual o RNA serviria como um elo físico intermédio entre o DNA e as proteínas. Tal sugestão foi mais tarde corroborada, demonstrando-se experimentalmente, que durante a expressão genética, a sequência de DNA é transcrita numa molécula de RNA mensageiro (mRNA), sendo esta posteriormente traduzida numa proteína funcional⁷.

Ao longo dos anos, com o avanço tecnológico, nomeadamente a nível das técnicas de sequenciação de alto rendimento e softwares computacionais, demonstrou-se que a maioria do genoma humano é de facto transcrito em RNA. No entanto apenas entre 1 a 2% codifica efetivamente proteínas⁸, fortalecendo a ideia de que o RNA é muito mais do que apenas uma molécula que se encontra envolvida no armazenamento e transferência de informação⁷.

O termo RNA não codificante (ncRNA) é habitualmente utilizado para definir RNA que não codifica proteínas. Tal como referido anteriormente, isso não significa que este não desempenha um papel importante no organismo. Pelo contrário, este é responsável por inúmeras funções a nível celular, nomeadamente intervindo como catalisador em diversas reações bioquímicas e na própria regulação genética. Esta regulação pode ocorrer em alguns dos níveis mais relevantes para a função do genoma, dos quais se destacam a arquitetura da cromatina, a segregação cromossómica, o *splicing* e processamento do RNA, a transcrição, a tradução e o *turnover* proteico⁹.

Assim, o ncRNA considerado como “lixo evolutivo” no passado, devido à falta de eficácia na tradução em proteínas, é agora reconhecido como tendo um impacto em diversos mecanismos moleculares e em relevantes funções biológicas¹⁰. Esta versatilidade surge pela capacidade do RNA em formar estruturas complexas, capazes de interagir com outras moléculas de RNA, DNA, proteínas e outras pequenas moléculas⁵. Além disso, pode também ser estabelecida uma correlação entre a quantidade de ncRNA existente num organismo e a complexidade do mesmo, o que robustece a influência que estes têm no desenvolvimento e organização dos seres vivos⁸.

Estes ncRNA são o resultado da transcrição generalizada do genoma humano e como constituem a grande maioria do genoma transcrito, têm sido alvo de diversos estudos, cujo principal objetivo é a compreensão e análise generalizada das funções desempenhadas pelos mesmos⁸.

O RNA regulatório encontra-se, então envolvido no centro das nossas características fisiológicas e genéticas mais complexas e em importantes processos biológicos a nível celular. Devido a essa razão, a sua desregulação ou expressão aberrante tem sido associada ao desenvolvimento de patologias agressivas. Assim, espera-se que através da sua análise surjam novos esclarecimentos sobre os mecanismos de regulação e disfunção de genes.

O RNA não codificante pode então ser classificado em dois grandes grupos: *small noncoding RNA* (sncRNA) e *long noncoding RNA* (lncRNA). O foco desta monografia são os sncRNA, que devido à sua potência e versatilidade, destacam-se como sendo promissores, para serem aplicados na terapêutica clínica¹¹. Neste grupo estão incluídos o micro RNA (miRNA), e o pequeno RNA de interferência (siRNA), os quais vão ser discutidos mais à frente nesta monografia.

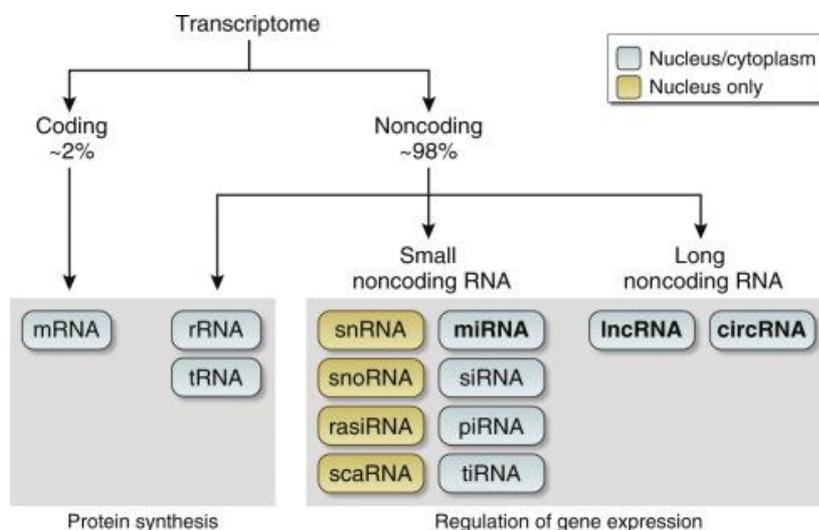


Figura 1 - Classificação do RNA. A maioria do RNA exerce funções reguladoras, sendo que apenas cerca de 2% do RNA é que codifica efetivamente proteínas. circRNA, RNA circular; lncRNA, long noncoding RNA; miRNA, microRNA; piRNA, piwi-interacting RNA; rasiRNA, repeat-associated small interfering RNA; scaRNA, small cajal body-specific RNA; siRNA, pequeno RNA de interferência; snoRNA, pequeno RNA nucleolar; snRNA, pequeno RNA nuclear; tiRNA, transfer RNA-derived stress-induced small RNA; tRNA, RNA de transferência [Adaptado de¹²]

2. SMALL INTERFERENCE RNA

Os *small interference* RNA (siRNA) são definidos como sendo pequenos fragmentos de RNA em cadeia dupla (dsRNA), compostos aproximadamente por 21 a 25 nucleótidos. Estes podem ter duas origens distintas, podendo assim ser diferenciados, de acordo com a sua natureza/etiologia. No caso de possuírem uma natureza endógena, o siRNA é derivado frequentemente de exões. Se por outro lado, tiver uma origem exógena, este é obtido a partir de um precursor de dsRNA, com origem em transfeções celulares, microinjeções ou material genético proveniente de infeções virais¹³.

A sua descoberta deve-se a dois cientistas, Andrew Fire e Craig Mello, que no ano de 1998 desmistificaram o mundo do RNA de interferência. Estes demonstraram que pequenas moléculas de RNA em dupla cadeia possuíam, efetivamente a capacidade de modular o silenciamento genético pós transcricional, atuando sobre o mRNA em nemátodos, pertencentes à espécie *Caenorhabditis elegans*¹⁴.

2.1- MECANISMO DE BIOSÍNTESE

A clivagem das longas moléculas de RNA em cadeia dupla, que subsequentemente originam os siRNA, são conseguidas pela ação de uma enzima, denominada de Dicer. Esta endonuclease, pertencente à família RNase III é responsável por fracionar a molécula de RNA, em fragmentos mais pequenos. Os siRNA resultantes deste processo apresentam um tamanho e terminais específicos, nos quais a extremidade 3' apresenta dois nucleótidos desemparelhados e a extremidade 5', um grupo fosfato¹⁴.

Tais características tão particulares, são essenciais para que estes fragmentos, depois de transportados para o citoplasma, sejam reconhecidos e incorporados no complexo silenciador induzido por RNA – complexo RISC (do inglês, *RNA induced silencing complex*), o qual induz o silenciamento de um RNA alvo, através da sua respetiva degradação ou repressão transcricional¹³. Alguns estudos recentes demonstraram que esta integração é conseguida pela intervenção da enzima Dicer, com o auxílio da proteína de ligação ao RNA, TRBP (do inglês, *transactivation responsive RNA binding protein*).

O complexo RISC é composto por um conjunto de proteínas, no entanto a proteína central, responsável pelo silenciamento de RNA é a proteína Argonauta 2 (AGO2), a qual é constituída por 3 domínios distintos, denominados de PAZ, MID e PIWI¹⁴. A ligação do siRNA a estes

domínios é estabelecida através dos terminais da cadeia de nucleótidos da mesma. A extremidade 3', com os dois nucleótidos extra é reconhecida especificamente pela cavidade hidrofóbica existente no domínio PAZ. Por outro lado, a extremidade 5', contendo o grupo fosfato insere-se entre os domínios MID e PIWI, através da ligação com o íon de magnésio aí existente¹⁴. O domínio PIWI também adota uma estrutura semelhante a uma RNase H, o que nos permite estabelecer a hipótese, de que este domínio é responsável pela atividade catalítica deste complexo.

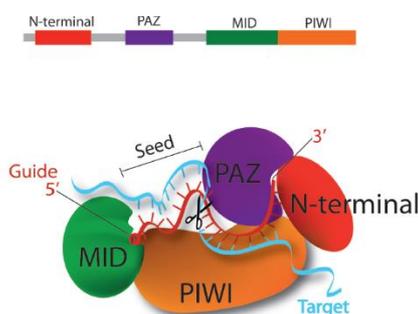


Figura 2 - Domínios da Proteína Argonauta-2. O grupo fosfato da extremidade 5' da cadeia guia encaixa-se entre os domínios MID e PIWI da proteína. O domínio PAZ apresenta uma bolsa hidrofóbica que reconhece especificamente os dinucleótidos desemparelhados existentes na extremidade 3' da cadeia guia. Este posicionamento permite simultaneamente a ligação da região seed ao mRNA alvo complementar e a orientação correta para que ocorra a clivagem do mesmo pelo domínio PIWI [Adaptado de ¹⁴]

O processo de separação da dupla cadeia do siRNA acontece, como mencionado anteriormente no complexo RISC. Durante este passo, uma das cadeias permanecerá ligada a proteína argonauta, enquanto que a outra é descartada. Estas cadeias são definidas como cadeia guia e cadeia passageira, respetivamente¹³. Assim, apenas a cadeia guia irá servir de molde para a degradação do mRNA alvo, cuja sequência de nucleótidos seja complementar à mesma. A seleção da cadeia guia é feita pela própria proteína, a qual favorece a ligação à cadeia que possui uma extremidade 5' menos estável, a nível termodinâmico¹⁴.

O emparelhamento entre a cadeia guia e o mRNA alvo é estabelecido através da região “seed”, a qual é definida como a sequência de bases que se situa entre a posição 2 e 8, da cadeia guia (a partir da extremidade 5'). Esta é fundamental para o silenciamento da sequência alvo, uma vez que apenas é necessária uma complementaridade perfeita nesta região, para que ocorra a degradação do mRNA alvo¹⁴.

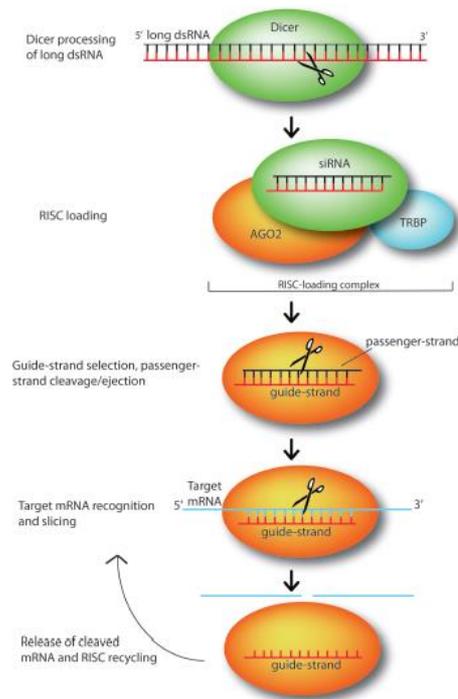


Figura 3 - Processo de Silenciamento de Genes mediado por siRNA. Os siRNA são responsáveis por mediar o silenciamento de genes alvo através do corte específico da sequência do mRNA alvo. Inicialmente, estes RNAs não codificantes são longas moléculas de RNA em cadeia dupla, que são posteriormente processados pela endonuclease Dicer, em sequências mais curtas com cerca de 21 a 25 nucleótidos. De seguida o duplex de siRNA é incorporado pela Dicer, com o a ajuda da proteína de ligação ao RNA, TRBP, no complexo silenciador induzido por RNA (RISC). Aqui a proteína argonauta 2 após selecionar a cadeia guia, cliva e ejeta a cadeia passageira. Esta ainda é responsável pela clivagem do mRNA alvo complementar a cadeia guia. Após este processo, tanto o complexo RISC, como a cadeia guia são reciclados, podendo ser usados em clivagens posteriores [Adaptado de ^{14]}

2.2- POTENCIAL E OBSTÁCULOS/DESAFIOS NO USO DE siRNA

O potencial do uso do RNA de interferência e consequentemente do siRNA na terapia génica é muito promissor, uma vez que teoricamente, podemos usar este mecanismo celular, para regular negativamente a expressão de genes de interesse¹⁵. Assim sendo, conhecendo-se a sequência de nucleótidos do gene alvo, podemos desenhar siRNA específicos, que poderão ser empregues como opções de tratamento em várias doenças, das quais se destacam doenças genéticas, doenças autoimunes, infeções virais e cancro. Outra grande vantagem do siRNA é a sua potência, uma vez que após a clivagem e libertação do mRNA alvo, tanto o complexo RISC, como a cadeia guia, poderão voltar a ser reutilizados, noutras clivagens¹⁴.

No entanto, esta estratégia revelou ter alguns problemas, uma vez que facilmente pode ocorrer o silenciamento de alvos, de forma não intencional. Ou seja, para que esta tecnologia

funcione, não é suficiente, apenas, conhecer de forma perfeita a sequência de mRNA homóloga ao gene de interesse, é também necessário ter em conta outras limitações inerentes ao siRNA, nomeadamente a sua fraca biodisponibilidade, a instabilidade na presença de nucleases, a hidrofobicidade e a sua natureza, sendo por isso necessário encontrar formas eficazes e práticas de contorná-las, antes de serem aplicadas na terapêutica¹⁶. Assim, podemos dividir estas limitações em três grupos: instabilidade *in vivo*, efeitos *off-target* e imunogenicidade.

A instabilidade do siRNA e a sua rápida degradação, quando submetido a condições fisiológicas *in vivo* é ainda considerada, uma das grandes barreiras que precedem o seu uso na terapêutica¹⁵. O siRNA é suscetível de ser facilmente degradado pela ação de enzimas, presentes no soro e nos tecidos, o que faz com que este apresente um tempo de semivida curto, quando presente no meio extracelular¹⁴. Algumas das causas, que poderão estar por trás deste curto tempo de circulação são, não só como mencionado anteriormente, a degradação enzimática no soro, mas também a clearance renal de moléculas com um peso molecular inferior a 50 kDa e a captura dos siRNA pelo sistema reticuloendotelial, uma vez que as células fagocitárias contribuem para a remoção de ácidos nucleicos estranhos ao organismo¹⁵.

Além disso, para ser efetivo num contexto de doença, o siRNA têm de ter uma boa biodisponibilidade, ou seja, tem de possuir a capacidade de alcançar os tecidos alvos que expressam o gene de interesse e de ser internalizado no citosol das células¹⁵.

Esta difusão através da membrana plasmática é também ela um obstáculo, uma vez que é dificultada pelo tamanho molecular (± 15 kDa) e pela carga altamente negativa apresentada pelo siRNA. Já após serem internalizados, além de continuarem a ser suscetíveis de sofrerem degradação enzimática pelas RNases intracelulares na célula, existe também a necessidade de estes serem reconhecidos e incorporados no complexo RISC¹⁴.

Além dos obstáculos que advém das propriedades físico-químicas, da estabilidade e da biodisponibilidade dos siRNA, nos tecidos alvos, existem outros dois fatores, igualmente importantes que não podem ser negligenciados. São eles o silenciamento *off-target* e a ativação da resposta imune.

O silenciamento *off-target* relaciona-se com a supressão de genes de forma não intencional, a qual pode traduzir-se em efeitos indesejáveis, uma vez que pode levar a mutações perigosas na expressão de genes e a modificações celulares inesperadas¹⁴. O mecanismo principal, pelo qual ocorre este silenciamento está relacionado com a interação específica entre as bases da

região “seed”, da cadeia guia, com inúmeros mRNA, o que posteriormente resulta na respetiva degradação dos mesmos. Ou seja, basta que exista uma homologia perfeita com os nucleótidos da região “seed”, para que daí resulte o silenciamento do mRNA complementar¹⁴.

A ativação da resposta imune inata pelo siRNA caracteriza-se pela indução de pequenas moléculas sinalizadoras designadas de citocinas, nas quais incluem-se as interleucinas, o interferão tipo I e o fator de necrose tumoral alfa. O desencadeamento desta resposta tem origem na estimulação dos recetores de reconhecimento de padrões (PRR), os quais apresentam a capacidade de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos. De forma geral, existem duas classes de PRR, capazes de detetar a presença de siRNA. São eles os recetores Toll-like (TLR), capazes de detetar e identificar regiões estruturalmente conservadas de patógenos exógenos ao organismo e os recetores citoplasmáticos. Dentro dos TLR, existem três com particular destaque, neste caso específico. O TLR3, expresso em endossomas e na superfície celular de populações específicas é capaz de reconhecer RNA em cadeia dupla. Os TLR 7 e 8 localizados exclusivamente em vesículas intracelulares, nomeadamente endossomas, lisossomas, células mielóides e células B ativam uma resposta imune na presença de sequências específicas de RNA de cadeia única¹⁷.

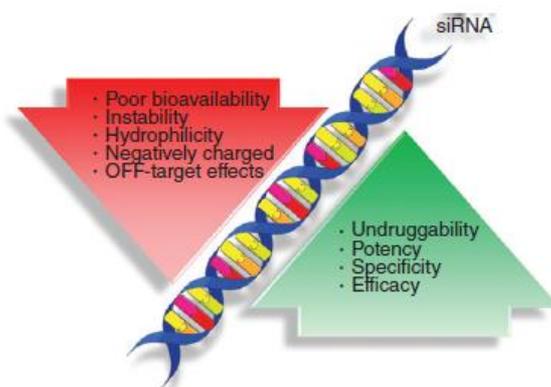


Figura 4 - Vantagens e Desvantagens do siRNA. Além dos efeitos indesejados fora do alvo, como é o caso da regulação positiva e negativa de genes não relacionados, foram identificadas também algumas limitações intrínsecas ao siRNA. Estas moléculas ao entrar na corrente sanguínea são prontamente degradadas pelas ribonucleases e pelo sistema reticuloendotelial, o que compromete a respetiva biodisponibilidade em condições fisiológicas. Além disso, a hidrofobicidade, o elevado peso molecular e a natureza polianiónica são também fatores que restringem a difusão passiva do siRNA através das membranas celulares. Apesar de todos estes obstáculos, as propriedades desta moléculas podem ser ajustadas, relativamente à capacidade de silenciamento de genes (potência, especificidade e eficácia [Adaptado de ¹⁶]

2.3- TERAPÊUTICAS EXISTENTES NO MERCADO- ONPATTRO

As terapêuticas baseadas na entrega de ácidos nucleicos nas células, são consideradas como sendo bastante atrativas, porque ao contrário das pequenas moléculas convencionais que têm como alvo, produtos da tradução de genes, como por exemplo as proteínas, estas terapias visam modular a expressão genética, nomeadamente através do silenciamento de genes¹⁸.

Como referido anteriormente, o uso de siRNA não modificado está sujeito a diversos obstáculos, que se relacionam com a sua fraca biodisponibilidade após administração sistémica. Assim, de modo a aperfeiçoar o seu uso na clínica, é necessário, a aplicação de modificações químicas e o desenvolvimento de novas formas de entrega do siRNA às células¹⁸.

O Onpattro (patisiran), trata-se então da primeira terapêutica de RNA de interferência (iRNA), existente no mercado. Este medicamento foi primeiramente aprovado nos Estados Unidos, pela Food and Drug Administration, no dia 10 de agosto de 2018, sendo posteriormente concedida a respetiva autorização de introdução no mercado pela Agência Europeia do Medicamento, para o tratamento da amiloidose hereditária mediada por transtirretina (ATTRh) em adultos¹⁹.

A ATTRh é uma doença multisistémica hereditária, causada por variantes presentes no gene que codifica a transtirretina, o que resulta na acumulação de depósitos amiloides no coração, nervos, trato gastrointestinal e outros órgãos. Esta é uma doença progressiva e fatal, com uma esperança média de vida, de apenas 4,7 anos após o seu diagnóstico¹⁹.

A transtirretina é uma proteína maioritariamente produzida pelos hepatócitos, que na sua forma normal se apresenta como um tetrâmero, ou seja, é composta por quatro monómeros idênticos. Esta é responsável por assegurar o transporte do retinol e da tiroxina no corpo. Os indivíduos com esta doença apresentam mutações no gene da transtirretina, que afetam a estabilidade do tetrâmero, resultando na sua dissociação em monómeros, os quais se agregam em depósitos amiloides, resistentes à degradação¹⁹.

O efeito terapêutico do patisiran, deve-se então ao silenciamento do gene da transtirretina nos hepatócitos, o que impede a produção da proteína mutante e reduz a formação de depósitos amiloides, traduzindo-se na interrupção ou mesmo na reversão do progresso da doença. Neste caso em particular a cadeia guia do patisiran (3'-

CAUUGGUUCUCAUAAGGUA-5') liga-se especificamente a uma sequência geneticamente conservada na região 3' não traduzida (3'UTR) do RNA mensageiro da transtirretina mutante (5'-GUAACCAAGAGUAUCCAUA-3'), para desencadear o silenciamento do gene mediado por RNA²⁰.

A elevada biodisponibilidade do patisiran no fígado é conseguida, através da sua encapsulação em nanopartículas lipídicas (LNPs, do inglês lipid nanoparticles), as quais além de proteger o siRNA da degradação, ajudam a melhorar a estabilidade, reduzem a ativação da resposta imune, facilitam a internalização e aumentam a afinidade para o alvo. Estes sistemas LNP-siRNA apresentam normalmente um diâmetro que varia entre 60 a 100 nm e contêm na sua composição quatro componentes lipídicos: o lípido catiónico ionizável (6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl-4-(dimethylamino) butanoate (DLin-MC3-DMA), a distearoilfosfatidilcolina ou DSPC, o colesterol e o (R)-methoxy-PEG2000-carbamoyl-di-O-myristyl-snglyceride (PEG2000-C-DMG)²¹.

As propriedades físico-químicas do lípido catiónico contribuem para a formulação, nomeadamente a formação da nanopartícula e a encapsulação da molécula de siRNA. Além disso, o DLin-MC3-DMA é responsável pela regulação da entrega do patisiran nos hepatócitos, o que inclui a captação celular, a fusão com a membrana endossomal e, finalmente, a libertação do siRNA do endossoma. A presença do PEG2000-C-DMG na formulação permite otimizar o tempo de circulação das LNPs, o que posteriormente traduz-se numa maior biodisponibilidade do patisiran nos hepatócitos. Estes lípidos peguilados apresentam a capacidade de formar uma camada hidrofílica protetora, que estabiliza a nanopartícula lipídica hidrofóbica. Após a administração intravenosa, as LNPs são opsonizadas pela apolipoproteína E (ApoE), que as direcionam para os hepatócitos. Estas partículas entram no fígado através das fenestrações vasculares existentes no endotélio, onde posteriormente se ligam aos receptores ApoE existentes na superfície das células hepáticas. De seguida, existe a internalização das NPs por endocitose e a fusão do componente lipídico, que fica ionizado com o endossoma. Assim, após a libertação do siRNA no citoplasma, este é facilmente reconhecido e incorporado no complexo RISC, desencadeando o silenciamento do gene mediado por RNAi²⁰.

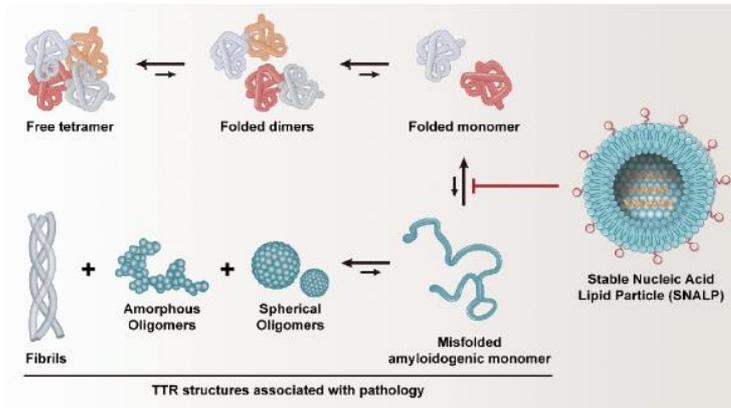


Figura 5 - Formação da transtiterina. Na porção superior, o correto enovelamento do tetrâmero da transtiterina a partir dos monômeros que a constituem e na porção inferior o enovelamento incorreto, que se traduz na formação de monômeros instáveis, responsáveis pela formação de depósitos de oligômeros esféricos, oligômeros amorfos e fibrilas amiloides, associados à doença [Adaptado de ¹⁹]

3- MICRORNA

Os microRNAs (miRNAs), tal como mencionado anteriormente constituem-se como uma classe dominante de RNA não codificante, com capacidade de se ligarem a cadeias de mRNA alvo complementares, induzindo assim a sua degradação ou inibição da respetiva tradução. Por esta razão são considerados essenciais na diferenciação, proliferação e sobrevivência celulares²².

3.1 MECANISMOS DE BIOSÍNTESE: VIA CANÓNICA E NÃO CANÓNICA

A biossíntese de miRNA trata-se de um processo complexo, no qual intervêm diversas enzimas e complexos proteicos, necessários para a sua produção e maturação²³. Este processamento que tem início no núcleo e termina no citoplasma, pode ocorrer através de duas vias distintas: via canónica e via não canónica. No entanto, aquela que se assume como sendo a mais predominante e estudada é a via canónica²⁴, a qual vai ser abordada em seguida.

O primeiro passo, na biogénese de miRNA através da via canónica é a transcrição do DNA, pela RNA polimerase II, o que origina a formação de longas cadeias primárias de miRNA, as quais contêm uma estrutura em forma de gancho, denominadas de pri-miRNA²². As extremidades desta sequência apresentam também elas modificações químicas. A extremidade 5' com a adição de um grupo *cap* e extremidade 3' com uma cauda poli-A, as quais têm como

principal função proteger o transcrito²³. Neste caso é importante salientar que maioria dos genes, a partir dos quais são codificados estes pri-miRNAs estão localizados em regiões compostas por intrões, contendo as suas próprias regiões promotoras²².

Ainda no núcleo, o pri-miRNA é submetido a diversas etapas de maturação efetuadas através do complexo microprocessador, o qual é constituído pela proteína de ligação ao RNA, DGCR8 (do inglês DiGeorge Syndrome Chromosome Region 8) e a enzima ribonuclease III, Drosha²⁴. Este processamento resulta na formação de uma molécula de RNA em dupla cadeia com aproximadamente 70 nucleótidos, denominada de precursor miRNA ou pré-miRNA²³.

Após esta clivagem, o pré-RNA vai ser transportado através do núcleo para o citoplasma das células, com o auxílio da proteína exportina 5. Já no citosol, por ação da enzima DICER, ocorre o passo final do processo de biossíntese, com a formação de uma molécula de RNA com cerca de 22 nucleótidos. Posteriormente, tal como acontece no mecanismo de ação do siRNA, existe a incorporação do miRNA no complexo RISC, onde por ação da proteína argonata é selecionada uma das cadeias, a qual constitui-se como sendo o miRNA maduro, capaz de ligar-se à sequência alvo²⁵.

Por outro lado, a síntese de miRNA através da via não canónica, faz uso de diferentes combinações das proteínas envolvidas na via canónica, das quais se destacam as proteínas Drosha, Dicer, exportina 5 e a proteína argonata-2. De um modo geral, podemos fazer a divisão em dois grupos distintos: via independente de Drosha/DGCR8 e/ou via independente da ação da enzima Dicer²⁴.

No processo de biossíntese de miRNAs através da via independente de Drosha/DGCR8, a produção de pré-RNAs ocorre no núcleo, a partir de outras moléculas²³. Um exemplo são os mirtrons, os quais são microRNAs produzidos durante o processo de *splicing*, a partir dos intrões que compõe o mRNA. Estes são posteriormente transportados para o citoplasma através da exportina I, não sendo assim necessário a clivagem por parte da enzima Drosha²⁴. Por outro lado, a síntese de microRNAs através da via independente da Dicer tem como origem pequenas moléculas endógenas de RNA em forma de gancho. A particularidade desta via é a participação da proteína argonata 2, em detrimento da enzima Dicer, no processo de maturação do pré-RNA²³.

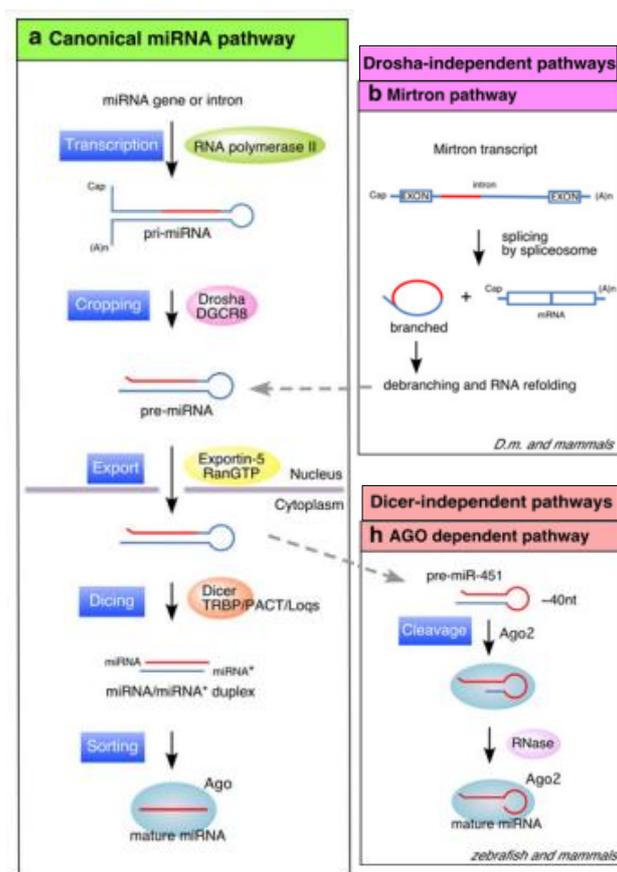


Figura 6 - Biossíntese de miRNA através da via canônica e não canônica. A) Os miRNAs através da via canônica são obtidos a partir da transcrição do genoma, com a formação de transcritos primários longos, denominados de pri-miRNAs. Estes apresentam uma estrutura em forma de gancho, a qual é processada no núcleo, em precursores de miRNA com cerca de 70 nucleótidos (pré-miRNAs), pelo complexo microprocessador. Após ser exportado para o citoplasma pela exportina-5 o pré-miRNA é novamente alvo de processamento, o que leva à formação do miRNA maduro, o qual é posteriormente incorporado na proteína argonauta. **B) Via derivada de mirtrons:** Intrões curtos, denominados de mirtrons podem ser clivados e desramificados, formando mimicos de pré-miRNA com estrutura em forma de gancho, contornando assim a clivagem pela Drosha. **C) Via independente de Dicer:** Após a clivagem pela Drosha, o pré-miRNA é incorporado diretamente na proteína argonauta [Adaptado de ³⁹]

3.2 PAPEL DO miRNA NO CANCRO

Desde os anos 2000, com a descoberta da existência de uma diminuição significativa na expressão dos miR-15 e miR-16 em doentes com leucemia linfoblástica, que o papel dos microRNA no cancro têm vindo a ser estudado, mais detalhadamente. Atualmente é reconhecida a associação que existe entre a desregulação destas moléculas e a evolução do processo carcinogénico²³. Os níveis de expressão de miRNA nas células tumorais além de possibilitarem a distinção destas, das células saudáveis, são também importantes para caracterizar o tipo de cancro e o estadiu do mesmo²⁶.

De acordo com a função do mRNA alvo, os microRNAs podem ser classificados como supressores tumorais ou como miRNAs oncogênicos (oncomiRs). Esta divisão tem por base o efeito modulador destas moléculas sobre a expressão do gene alvo.

De forma geral, os oncomiRs atuam inibindo negativamente genes supressores do tumor ou genes que controlam os processos de diferenciação ou apoptose²⁷. Por outro lado, os miRNAs que funcionam como supressores tumorais são aquela cuja expressão se encontra diminuída. De modo geral, estes previnem a progressão do tumor através da inibição de oncogenes e/ou genes necessários para a proliferação celular²⁷. Na tabela abaixo encontra-se apresentado a influência de alguns miRNAs específicos no desenvolvimento de processos oncológicos.

miRNAs	Diseases	Important mRNA targets
<i>miRNAs with tumour suppressive function (miRNA mimics as therapeutics)</i>		
let-7 family	<ul style="list-style-type: none"> • Solid tumours (e.g. breast, colon, ovarian, lung, liver and glioma) • B cell lymphoma 	MYC, BCLXL, pan-RAS, EZH2, HMGA2, FAS, P21, PGRMC1 and DICER1
miR-34a	<ul style="list-style-type: none"> • Solid tumours (e.g. lung, liver, colon, brain, prostate, pancreatic, bladder and cervical) • Myeloma • B cell lymphoma 	BCL2, MET, MYC, CDK6, CD44, SRC, E2F1, JAG1, FOXP1, PDGFRA, PDL1 and SIRT1
<ul style="list-style-type: none"> • miR-143 • miR-145 	<ul style="list-style-type: none"> • Solid tumours (e.g. bladder, lung, breast, colon, pancreas, cervical, and head and neck) • Lymphoid leukaemia 	KRAS, ERK5, VEGF, NFKB1, MYC, MMPs, PLK1, CDH2 and EGFR
miR-200 family	Solid tumours (e.g. breast, ovarian and lung)	ZEB1, ZEB2, BMI1, SUZ12, JAG1, SOX2, SP1, CDH1 and KRAS
<i>OncomiRs (antimiRs as therapeutic agents)</i>		
miR-10b	Solid tumours (e.g. breast and glioma)	NF1, CDH1, E2F1, PIK3CA, ZEB1 and HOXD10
miR-155	<ul style="list-style-type: none"> • Solid tumours (e.g. liver, lung, kidney, glioma and pancreas) • B cell lymphoma • Lymphoid leukaemia 	SHIP, SPI1, HDAC4, RHOA, SOCS1, BCL2, JMJD1A, SOX6, SMAD2, SMAD5 and TP53INP1
<ul style="list-style-type: none"> • miR-221 • miR-222 	Solid tumours (e.g. liver, pancreas and lung)	CDKN1B, CDKN1C, BMF, RB1, WEE1, APAF1, ANXA1 and CTCF

Figura 7 - Influência de alterações de miRNA no cancro. A parte superior corresponde aos miRNAs com atividade supressora de tumor; a terapêutica neste caso passa pelos mimicos de miRNA. Na parte inferior estão apresentados os miRNAs com atividade oncogênica; a terapêutica nesta situação são os oligonucleótidos anti-miRNA [Adaptado de ²²]

3.3 MODULAÇÃO TERAPÊUTICA DOS miRNAs

A capacidade de modular a expressão e atividade in vivo dos miRNA possibilita a oportunidade de desenvolvimento de abordagens terapêuticas inovadoras para o tratamento de várias doenças, nomeadamente o cancro. As terapêuticas baseadas em microRNA, podem então ter

como objetivo restaurar a expressão do miRNA com atividade supressora de tumor ou pelo contrário bloquear miRNAs com atividade oncogénica²⁸.

As estratégias que visam um aumento no ganho de função dependem essencialmente da utilização de mímicos de miRNA. Os mímicos são pequenas moléculas sintéticas de RNA em cadeia dupla, cuja sequência coincide com o miRNA correspondente. Estas têm como objetivo, repor a expressão de miRNAs que se encontra diminuída em caso de doença. A sua ligação ao mRNA oncogénico, resulta na regulação negativa do mRNA alvo, através do sequestro ou degradação do mesmo²⁹.

Pelo contrário os sistemas que pretendem a modulação da perda de função dos miRNA conseguem obtê-lo principalmente através da aplicação de miRNA *sponges*, miRNA *masks* e oligonucleótidos antisense direcionados a miRNAs (antimiRs)²⁸.

A utilização de miRNA *sponges* baseia-se na expressão de moléculas de RNA compostas por diversos locais de ligação complementares ao miRNA alvo, que atuam como “armadilhas”, o que resulta na captura dos mesmos. Neste caso, como os miRNA *sponges* são específicos para a região *seed* do miRNA alvo, estes possuem a capacidade de bloquear uma família inteira de miRNA, detentora desta mesma sequência, o que poderá traduzir-se em efeitos indesejáveis²⁸.

A utilização miRNA *masks*, tem um fundamento oposto à situação mencionada anteriormente. Ou seja, ao invés de bloquear o miRNA alvo, neste caso ocorre a proteção da molécula de mRNA, cuja função se pretende preservar, permitindo a expressão da proteína de interesse²⁸.

Por fim, uma das abordagens mais populares fundamenta-se na síntese de oligonucleótidos antisense. Estes antimiRs definem-se como sendo pequenas moléculas sintéticas de cadeia simples, com uma sequência complementar ao miRNA que se pretende inibir, sendo assim capaz de se ligar fortemente a este, inibindo a sua função²⁹.

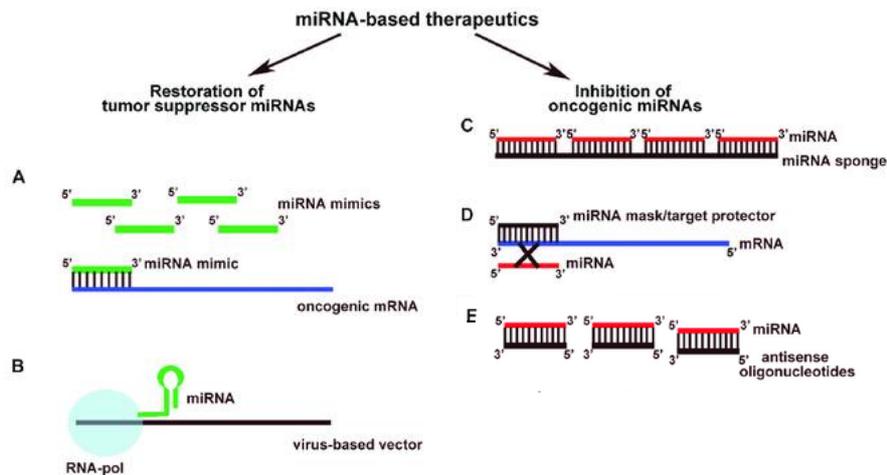


Figura 8 - Estratégias de utilização de miRNA na terapêutica. Terapêuticas cujo objetivo é a restauração dos níveis de miRNAs supressores de tumor: (A) mimicos sintéticos de miRNA; (B) miRNAs supressores de tumor expressos endogenamente a partir de vetores baseados em vírus. Terapêuticas destinadas à inibição de miRNA oncogênicos: (C) miRNA sponges; (E) oligonucleótidos antisense [Adaptado de ³⁰]

A primeira terapêutica baseada em anti-miRs a avançar para ensaios clínicos foi o Miravirsen, para o tratamento da hepatite C. Este medicamento experimental tem como alvo terapêutico o miR-122, o qual está diretamente envolvido no desenvolvimento hepático. Concomitantemente, este microRNA participa também no ciclo de replicação celular do vírus da hepatite C, através do qual ajuda a estabilizar o genoma viral, protegendo-a da degradação nucleolítica e da resposta imune inata do hospedeiro^{31,32}.

O Miravirsen é um oligonucleótido antisense de terceira geração, cuja sequência é complementar tanto ao miR-122 maduro, como aos seus precursores (pre-miR122 e pri-miR-122). Esta ligação vai posteriormente impedir a biossíntese do microRNA maduro, traduzindo-se no bloqueio da interação deste miR-122 com os seus alvos, nomeadamente ao nível da replicação celular viral³². Os ASOs de terceira geração, diferenciam-se das restantes gerações pelas suas modificações químicas, as quais foram implementadas com o intuito de melhorar o perfil farmacocinético, aumentar o uptake intracelular e a eficácia da entrega no alvo. Uma das alterações mais comuns e que se aplica nesta terapêutica é a inclusão de ácidos nucleicos bloqueados, isto é a modificação da ribose com uma ponte extra que conecta o oxigênio 2' e

o carbono 4' da mesma. Na **Tabela I**, apresentada abaixo, encontram-se listadas algumas das principais diferenças entre as várias gerações de oligonucleótidos antisense.

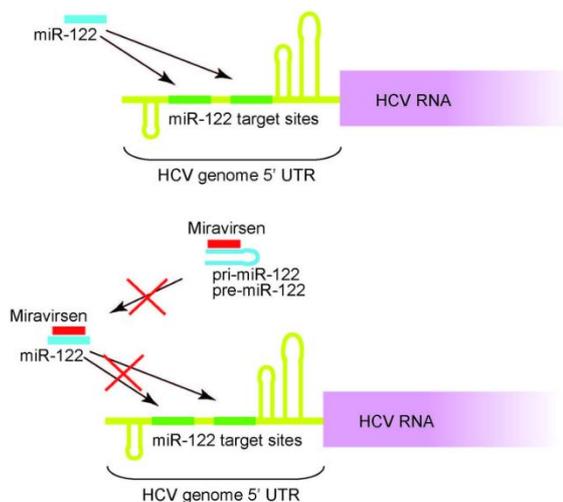


Figura 9 - Mecanismo de Ação do Miravirsen. A) O miR-122 liga-se a dois locais na região 5' não traduzida do genoma do vírus da hepatite C, promovendo a sua propagação. B) O Miravirsen liga-se complementarmente às sequências de miR-122 maduro, o que resulta na inibição funcional do miR-122. Além disso, este apresenta também a capacidade de ligar-se à estrutura do pri-miRNA e do pré-miRNA, inibindo assim a respetiva maturação [Adaptado de ³¹]

ASOs	Ativação da RNase H	Capacidade de Penetração nas Células	Estabilidade in vivo	Ligação ao mRNA alvo	Efeitos off-target
1ª geração (fosforotioato, metilfosfonato)	SIM	Moderada	Estabilidade às nucleases elevada	Baixa	Efeitos não específicos mais pronunciados
2ª geração (2'-O-Metoxietil, 2'-O-Metil)	NÃO	Moderada	Estabilidade às nucleases muito elevada	Elevada	Efeitos não específicos mais pronunciados
3ª geração (Ácidos nucleicos bloqueados, Ácidos nucleicos peptídicos, Oligómero morfolino)	NÃO	Elevada	Resistente às nucleases	Muito Elevada	Moderados

Tabela I – Resumo das propriedades de três gerações de oligonucleótidos antisense

Além do Miravirsen, existem outras terapêuticas anticancerígenas em fases de ensaios clínicos, como é o caso do MRX34, indicado no tratamento de cancro de fígado primário e em metástases hepáticas provenientes de outros tumores sólidos. Este é um mímico do miRNA-34, o qual é um regulador natural bem caracterizado da supressão tumoral, cujos níveis de expressão se encontram significativamente reduzidos na maioria dos cancros. Este miRNA é responsável pela inibição de várias moléculas sinalizadores, as quais contribuem para o desenvolvimento de processos cancerígenos, nomeadamente a proliferação celular, antiapoptose, metástase e quimiorresistência.

4. VACINAS

O desenvolvimento de vacinas baseadas em ácidos nucleicos, surgiu na década de 90. O objetivo principal consistia na produção rápida de vacinas seguras e eficazes, que pudessem ser aplicadas em diferentes áreas terapêuticas, com particular destaque na prevenção de doenças infecciosas e na oncologia³³. Algumas vacinas atualmente em desenvolvimento com base nesta tecnologia encontram-se listadas no anexo I.

O fundamento das vacinas baseadas em mRNA baseia-se na estimulação da imunidade adquirida e adaptativa, através da transferência de RNA para as células, o qual irá posteriormente ser expresso e traduzido em antígenos proteicos, responsáveis por desencadear uma resposta imune no organismo³⁴.

Teoricamente, as vacinas de mRNA apresentam inúmeras vantagens, comparativamente às convencionais. Alguns benefícios são o facto de o mRNA não se integrar no genoma, ao contrário do que acontece em algumas vacinas virais, o que elimina potenciais preocupações relativamente à possibilidade de serem inseridas mutações no código genético. Outro fator relaciona-se com a forma de produção destas vacinas, a qual é independente de células. Isto traduz-se numa produção custo efetiva, rápida e facilmente transponível de escala. Uma outra vantagem está relacionada com a possibilidade de uma única formulação, ou seja, uma única vacina de mRNA poder codificar diferentes antígenos, o que poderá ser útil, na presença de patógenos resilientes ou quando o alvo abrange mais que um microrganismo³⁵.

No entanto, esta tecnologia não sofreu muitos avanços, devido a preocupações, relativas à sua estabilidade, falta de eficácia e excesso de imunoestimulação. A pandemia de COVID-19

(SARS-CoV-2), neste caso veio despoletar um novo crescimento e interesse por parte da indústria farmacêutica nesta área. Isto deveu-se à aprovação de duas vacinas de mRNA, a da Pfizer-BioNTech e da Moderna³³.

4.1 PRÍNCIPIOS E SÍNTESE DE mRNA

As vacinas de RNA são constituídas por moléculas sintéticas de mRNA, que codificam os antígenos, responsáveis pela estimulação da resposta imune. Estas podem ser divididas em duas categorias: *self-amplifying RNA* (saRNA) e o *non-replicating RNA*.

O mRNA convencional *non-replicating* é composto na extremidade 5' por uma estrutura cap e por uma cadeia poliadenilada na extremidade 3'. Entre estas, encontra-se a sequência que codifica o antígeno, denominada de *open reading frame* (ORF), a qual está ladeada por duas regiões não traduzidas, definidas como *untranslated regions*³⁶. O saRNA é uma molécula em tudo igual à anterior, no entanto apresenta um tamanho bastante superior, devido à presença de sequências que codificam replicases de RNA, as quais permitem a amplificação da cadeia original. Assim é possível a partir de pequenas quantidades de mRNA, obter uma elevada expressão de antígenos³⁵.

A estabilidade do mRNA está diretamente relacionada com a estrutura 5' cap, a qual é composta por um nucleosídeo 7-metilguanósina, com carga positiva, que se encontra ligado através de uma ponte de trifosfato à extremidade 5' do mRNA³⁴. Esta estrutura é necessária para a iniciação da tradução, a partir do códon de iniciação AUG. A sua presença funciona como um sinal, que permite o reconhecimento do mRNA pelos ribossomas e posteriormente a sua ligação aos mesmos³⁴. Outra função desta estrutura é a proteção do mRNA da degradação por exonucleases.

As UTRs são zonas igualmente importantes, com um papel fundamental na regulação da tradução, tempo de semivida e localização subcelular do mRNA. De forma geral, é preferível a utilização de UTRs de ocorrência natural, derivadas de genes com uma expressão elevada, como é o caso dos genes que codificam a α - e β -globina³⁵. No entanto, isto nem sempre é exequível, visto que o seu desempenho pode estar dependente do tipo de célula. Assim, pode ser necessário o uso de sequências de UTR modificadas, devidamente otimizadas, tendo em conta o seu propósito e as células alvo³⁵. Na extremidade 3', esta sequência minimiza a degradação do mRNA através da eliminação de locais de ligação ao miRNA e regiões ricas em

adenina e uracilo. Por outro lado, na extremidade 5' são minimizadas as sequências com uma estrutura secundária e terciária, como por exemplo hairpins, as quais previnem o mecanismo de *scanning* dos ribossomas, dificultando a respetiva ligação ao codão de iniciação³⁵.

Uma das porções mais críticas, no desenvolvimento das vacinas de mRNA é a região codificante, a qual contém a sequência que será traduzida. A ORF não é tão fácil de modificar, como as secções anteriormente referidas, no entanto existem estratégias que permitem melhorar o processo de tradução, sem alterar a sequência original. Uma abordagem baseia-se na redundância do código genético, em que múltiplos codões codificam o mesmo aminoácido. Assim uma hipótese é a substituição de codões mais raros, por codões com ocorrência mais frequente, que codificam o mesmo resíduo de aminoácido. Apesar de ser uma estratégia muito atrativa é necessário ter em consideração que algumas proteínas necessitam duma taxa de tradução mais baixa, associada aos codões mais raros, para conseguir um enovelamento correto da mesma³⁵.

Outra forma de atuação é a incorporação de nucleósidos modificados na sequência de mRNA. Esta alternativa é efetiva, uma vez que o mRNA não modificado é rapidamente reconhecido por recetores de reconhecimento de padrões, como é o caso dos recetores TLR7 e TLR8, os quais têm a capacidade de ligar-se a regiões do mRNA ricas em guanina e uridina. Esta ligação, ativa a produção de interferões do tipo I, nomeadamente interferão α , o qual bloqueia a tradução do mRNA. Assim, sendo a utilização de nucleósidos modificados, particularmente uridina modificada, permite a evasão a estes PRRs, o que se traduz posteriormente na tradução e conseqüente produção das proteínas³⁵.

A adição de uma cadeia poliadenilada com 250-300 bases na extremidade 3' é um processo comum a quase todos os eucariotas, que ocorre após a transcrição. Um aspeto importante neste processo é o tamanho desta cadeia, o qual está relacionado com a estabilidade, transporte e tradução do mRNA maturo. No citoplasma, esta cadeia trabalha sinergicamente com o 5'cap para formar uma estrutura estável em forma de *loop*, com o fator de iniciação eucariótica 4F, de forma a promover o início da tradução³⁴. Esta cadeia é também muito importante para garantir a estabilidade do mRNA, uma vez que o protege da degradação enzimática, nomeadamente da ação das exonucleases³⁴.

4.2 SISTEMAS DE ENTREGA DE mRNA

A entrega do mRNA nas células alvo é um processo crítico e desafiante no desenvolvimento destas vacinas. Os ácidos nucleicos exógenos, sem qualquer veículo são facilmente reconhecidos pelo sistema imune, sendo posteriormente degradados pelas nucleases³⁴. Além disso, o mRNA é uma molécula grande (10⁴ – 10⁶ Da), com carga negativa, o que impossibilita a sua passagem através da bicamada fosfolipídica aniônica³⁵.

De forma a ultrapassar estes obstáculos e melhorar a eficiência das vacinas, procurou-se estudar e desenvolver outros sistemas de entrega, que possibilitem uma adequada proteção e entrega do mRNA às células alvo, com particular destaque na nanotecnologia.

4.2.1 Poliplexos e Lipoplexos

A utilização de lipossomas conjugados com polímeros ou lípidos foram os primeiros sistemas empregues na entrega de vacinas de mRNA às células, com recurso a lipossomas. Estes são definidos como vesículas formadas por um núcleo aquoso, onde se encontra o mRNA, revestido por uma ou múltiplas camadas fosfolipídicas. A sua estrutura esférica é formada através de interações hidrofílicas e hidrofóbicas entre a cabeça polar e a cauda apolar que constituem os fosfolípidos³⁴.

Os poliplexos e lipoplexos resultam da interação electrostática que ocorre entre o mRNA, com carga negativa e os polímeros e lípidos catiónicos, respetivamente. A encapsulação do mRNA permite a sua proteção das enzimas, nomeadamente da ação da RNase, isto é, existe um aumento de eficácia na entrega, que resulta da diminuição na sua degradação no organismo³⁴.

4.2.2 Nanopartículas Lipídicas

Atualmente, as nanopartículas lipídicas (LPNs) são o veículo de entrega de mRNA mais avançado na clínica. Para isso contribuiu a aprovação das vacinas da Pfizer-Biontech e da Moderna, as quais têm por base este sistema³⁵. As LNPs para além da proteção que conferem ao mRNA durante a circulação sistémica, apresentam também outros benefícios, que estão relacionados com a facilidade na formulação, a natureza biocompatível e biodegradável dos seus constituintes e a elevada eficiência de encapsulação^{33 35}. De forma geral, estas são constituídas por quatro componentes, que associados encapsulam e protegem o núcleo onde

se encontra o mRNA. São eles o lípido ionizável, colesterol, fosfolípido auxiliar (*helper*) e lípido PEGuilado³⁵.

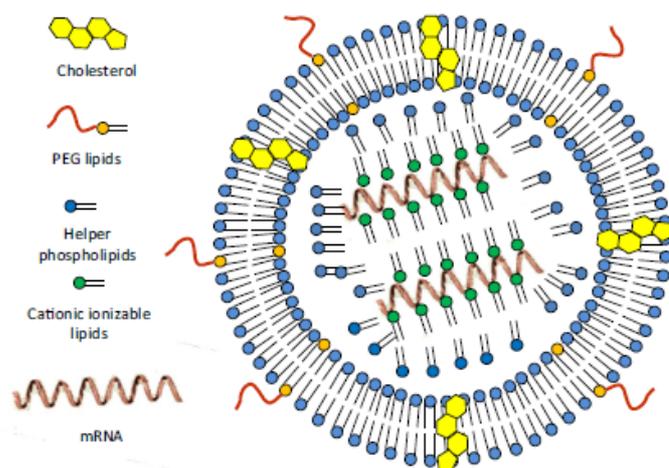


Figura 10- Representação esquemática dos componentes que constituem as nanopartículas lipídicas de mRNA [Adaptado de ³³]

A presença dos lípidos cationicos na formulação é necessária não só para a complexação e encapsulação do mRNA, mas também para uma entrega eficiente dos complexos no citoplasma das células. A complexação é conseguida através de interações electroestáticas entre o lípido com carga positiva e o mRNA, carregado negativamente. Por sua vez, a entrega do mRNA nas células é obtida através da internalização das LNPs por endocitose³³.

Para que seja possível aperfeiçoar o processo de complexação e posteriormente da entrega do mRNA é necessário a utilização de um lípido com uma constante de dissociação ácida (pKa) adequada. Assim, quando o pH é menor que o pKa do grupo amina ionizável, os lípidos cationicos encontram-se protonados, adquirindo carga positiva. Por outro lado, estes apresentam carga neutra quando o pH é maior que o pKa³³.

Este fator é importante porque durante a circulação sistémica (pH = 7.4) a carga é neutra, o que contribuiu para a redução da toxicidade sistémica e um prolongamento do tempo de circulação das LNPs³⁵. Este fator, contribui para um aumento apreciável do tempo de semivida da nanopartícula em circulação, que posteriormente traduz-se numa maior acumulação em tecidos alvos e numa maior biodisponibilidade³⁷.

Por outro lado, no ambiente ácido dos endossomas (pH ~ 6.5), o grupo amina fica protonado, ou seja, com carga positiva, o que promove a fusão das LNPs com a membrana endossomal, com subsequente libertação no citoplasma. Assim, idealmente estes lípidos devem possuir um pKa entre 6 e 7³⁵. Na tabela I é apresentado os lípidos utilizados nas formulações das vacinas de mRNA atualmente aprovadas.

A sua natureza ionizável é também responsável por uma melhoria substancial, a nível do perfil de segurança e tolerabilidade do organismo, uma vez que os lípidos que apresentam uma carga positiva permanente estão diretamente associados a toxicidade celular, nomeadamente através da estimulação do sistema imune e formação de agregados com subsequente deposição dos mesmos nos vasos sanguíneos³⁷.

Brand name	Cationic ionizable lipid	pK _a of the ionizable head group
Onpattro™	((6Z,9Z,28Z,31Z)-Heptatriaconta-6,9,28,31 tetraen-19-yl-4-(dimethylamino) butanoate (DLin-MC3-DMA)	6.44
Comirnaty™	((4-Hydroxybutyl)azanediyl)bis(hexane-6,1-diyl)bis(2-hexyldecanoate), ALC-0315	6.09
Spikevax™	(Heptadecan-9-yl 8-((2-hydroxyethyl) (6-oxo-6-(undecyloxy) hexyl) amino) octanoate); SM102	6.75

Figura 10 - Lípidos Catiônicos e respetivas constantes de dissociação ácidas usados em formulações atualmente aprovadas [Adaptado de ³³]

Os lípidos PEGuilados, existentes na camada mais externa são também um outro componente chave para o uso eficaz de LNPs na terapêutica. A nível estrutural, este é constituído por uma porção hidrofílica, composta por um polímero de polietilenoglicol e uma porção lipídica hidrofóbica³⁷.

De modo geral, o polímero PEG já tem vindo a ser utilizado em outros sistemas lipossomais, uma vez que funciona como uma barreira, prevenindo a opsonização por parte das células do sistema reticuloendotelial, o que contribui para um aumento no tempo de circulação e consequentemente da sua biodisponibilidade em tecidos alvos. A sua utilização na entrega de ácidos nucleicos, tem também vindo a ser explorada, uma vez que existe uma relação de proporcionalidade inversa entre o teor de PEG e o tamanho da partícula. Além disso, a presença deste lípido no processo de fabrico das nanopartículas, também assegura a produção de uma população de partículas homogêneas, com um índice de polidispersão estreito³⁷.

Como referido anteriormente, além das suas aplicações já conhecidas em outros sistemas, nomeadamente através da prevenção da opsonização, os lípidos PEG caracterizam-se por

interferir noutros fatores importantes, relacionados com a eficiência de encapsulação e a entrega do respetivo *drug loading* às células alvo.

Apesar das inúmeras vantagens, também foi verificado que esta camada mais externa das LNP pode também ser em certos casos ser prejudicial para o processo de endocitose, uma vez que dificultam o processo de fusão das nanopartículas com a bicamada fosfolipídica. Assim, de forma a otimizar o processo de transfeção celular foram desenvolvidos lípidos PEG com capacidade de difusão, contendo duas cadeias de catorze carbonos. Estes são capazes de se dissociarem rapidamente das nanopartícula lipídicas na presença de um reservatório lipídico, como é o caso das lipoproteínas séricas.

Outra vantagem importante, que advém da habilidade de difusão destes lípidos é a diminuição da produção de anticorpos induzidos por PEG, os quais por sua vez estão intimamente associados a um aumento da clearance das LNP do sangue e a um agravamento da hipersensibilidade após administrações repetidas.

Além dos componentes referidos acima, as formulações de LNPs apresentam também outros constituintes lipídicos, como é o caso dos fosfolípidos e do colesterol. Os fosfolípidos contribuem para a melhoria de propriedades inerentes às nanopartículas, das quais se destacam, a eficácia de entrega, a tolerabilidade e a biodistribuição³⁸. Estes geralmente são neutros, como é o caso do DSPC, o qual apresenta uma geometria cilíndrica e uma temperatura de transição de ~54 °C. Estas características permitem a formação de uma fase lamelar, que estabiliza a estrutura das NPs³⁸. A alteração do perfil de libertação do mRNA é passível de ser modificado, através da combinação do DSPC com outros fosfolípidos saturados, que apresentem uma temperatura de transição lipídica significativamente mais alta³³.

O colesterol é um lípido neutro, capaz de melhorar a estabilidade das nanopartículas, através da modulação da integridade e rigidez da membrana fosfolipídica. A geometria molecular característica dos derivados do colesterol pode ainda ter influência a nível da eficácia na entrega e biodistribuição das LNPs. Por exemplo, o uso de análogos do colesterol com C-24 alquil fitoesteróis melhoram significativamente a eficácia da entrega *in vivo* de nanopartículas lipídicas contendo mRNA encapsulado^{33,38}.

5. CONCLUSÃO

O RNA é uma molécula promissora do ponto de vista da aplicação na terapêutica clínica, visto que desempenha diversas funções fundamentais para a manutenção da homeostase no organismo, bem como pelo facto de que alterações e desregulação destas moléculas, estão associadas ao surgimento e consequente desenvolvimento de diversas doenças. Aproximadamente 98% do RNA não codifica proteínas, sendo essa categoria particularmente relevante na área da biologia sintética.

A terapia génica sofreu um grande avanço com a descoberta do RNA de interferência (siRNA, miRNA), uma vez que estes podem ser desenhados e construídos em laboratório, com o intuito de modular a expressão genética, nomeadamente através do silenciamento específico de genes alvo. Este tipo de terapêutica apresenta um grande potencial, quando comparado com as terapêuticas designadas de convencionais, uma vez que são potentes, eficazes e versáteis.

Apesar dos benefícios demonstrados, são também vários os obstáculos e desafios que têm de ser superados, de forma a que estes sejam aprovados pelas diferentes autoridades do medicamento, designadamente através do desenvolvimento de estratégias que evitem efeitos *off-target* e uma otimização dos sistemas de entrega destas moléculas nas células alvo.

A pandemia foi também responsável por grandes avanços a nível científico, os quais foram alcançados em tempo recorde, designadamente através da aprovação das duas primeiras vacinas de mRNA. Este aspeto, aliado ao facto da possibilidade do mRNA ser produzido e posteriormente modificado quimicamente, utilizando sistemas de expressão *in vitro*, ou seja, sem recurso a sistemas biológicos foi crucial para um novo investimento por parte das grandes indústrias farmacêuticas na área da biologia sintética com foco na terapia génica e na nanotecnologia.

Concluindo, as terapias baseadas em RNA estão numa fase de grande crescimento e inovação, com a existência de diversos ensaios clínicos a decorrer atualmente. Apesar de já terem sido aprovadas algumas terapêuticas, que têm por base esta tecnologia e dos resultados positivos demonstrados no decorrer de vários estudos *in vitro* e modelos experimentais, é necessário ainda ultrapassar diferentes obstáculos, que têm atrasado a progressão e aceitação destas moléculas na realidade da terapêutica atual.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tan, X., Letendre, J., Collins, J., & Wong, W. (2021). Synthetic biology in the clinic: engineering vaccines, diagnostics, and therapeutics. *Cell*, 184(4), 881–898. doi:10.1016/j.cell.2021.01.017
2. Bartley, B., Kim, K., Medley, J., & Sauro, H. (2017). Synthetic Biology: Engineering Living Systems from Biophysical Principles. *Biophysical Journal*, 112(6), 1050–1058. Doi: 10.1016/j.bpj.2017.02.013
3. Karoui, M. El, Hoyos-flight, M., & Fletcher, L. (2019). Future Trends in Synthetic Biology, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 175(7), 1-8. doi:10.3389/fbioe.2019.00175
4. Liang, J., Bloom, R., & Smolke, C. (2011). Engineering Biological Systems with Synthetic RNA Molecules. *Molecular Cell*, 43(6), 915–926. doi:10.1016/j.molcel.2011.08.023
5. Dykstra, P., Kaplan, M., & Smolke, C. (2022). Engineering synthetic RNA devices for cell control. *Nature Reviews*, 23, 215-228. doi:10.1038/s41576-021-00436-7
6. Isaacs, F., Dwyer, D., & Collins, J. (2006). RNA synthetic biology. *Nature Biotechnology*, 24(5), 545–554. doi:10.1038/nbt1208
7. Gomes, A. Q., Nolasco, S., & Soares, H. (2013). Non-Coding RNAs: Multi-Tasking Molecules in the Cell. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 16010-16039 doi: 10.3390/ijms140816010
8. Beermann, J., Piccoli, M., Viereck, J., & Thum, T. (2016). Non-coding RNAs in development and disease: background, mechanisms, and therapeutic approaches. *American Physiological Society*, 96, 1297–1325. doi: 10.1152/physrev.00041.2015
9. Walker, J. (2012). Methods in molecular biology. *In Methods in Molecular Biology*, 935, 1-518. doi:10.3109/9781420019957-3
10. Riella, C. (2019). Pequenos RNAs não codificantes: do lixo ao tesouro. *Brazilian Journal of Nephrology*, 41(2), 168-169. doi.org/10.1093/nar/gkz097
11. Smith, E., Whitty, E., Yoo, B., Moore, A., Sempere, L., & Medarova, Z. (2022). Clinical Applications of Short Non-Coding RNA-Based Therapies in the Era of Precision Medicine. *Cancers*, 14 (1588), 1–24. doi:10.3390/cancers14061588
12. Brandenburger, T., Salgado Somoza, A., Devaux, Y., & Lorenzen, J. M. (2018). Noncoding RNAs in acute kidney injury. *Kidney International*, 94(5), 870–881. doi:

10.1016/j.kint.2018.06.033

13. Wilson, R., & Doudna, J. (2013). Molecular Mechanisms of RNA Interference. *Annual Review of Biophysics*, 42, 217-239. doi: 10.1146/annurev-biophys-083012-130404
14. Gavrillov, K., & Saltzman, W. (2012). Therapeutic siRNA: Principles, challenges, and strategies. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 85(2), 187–200.
15. Sook, K., Sung, J., Yeon, L., Kwangmeyung, K., & Suan, K. (2015). Chemical and structural modifications of RNAi therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 114, 16-28. doi: 10.1016/j.addr.2015.10.015
16. Alagia, A., & Eritja, R. (2016). siRNA and RNAi optimization. *WIREs RNA*, 7, 316-329. doi: 10.1002/wrna.1337
17. Kanasty, R., Whitehead, A., Vegas, A., & Anderson, G. (2012). Action and reaction: The biological response to sirna and its delivery vehicles. *Molecular Therapy*, 20(3), 513–524. doi:10.1038/mt.2011.294
18. Kulkarni, J., Witzigmann, D., Chen, S., Cullis, P., & Van Der Meel, R. (2019). Lipid Nanoparticle Technology for Clinical Translation of siRNA Therapeutics. *Accounts of Chemical Research*, 52(9), 2435–2444. doi:10.1021/acs.accounts.9b00368
19. Saw, P., & Song, E. (2020). siRNA therapeutics: a clinical reality. *Science China Life Sciences*, 63(4), 485–500. doi: 10.1007/s11427-018-9438-y
20. Titze, S., Brandão, P., Faber, I., & Almeida, R. (2019) Leading RNA Interference Therapeutics Part I : Silencing Hereditary Transthyretin Amyloidosis , with a Focus on Patisiran. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 24(1), 49-59. doi: 10.1007/s40291-019-00434-w
21. Kulkarni, J., Witzigmann, D., Leung, J., Tam, Y., & Cullis, P. (2019). On the role of helper lipids in lipid nanoparticle formulations of siRNA. *Nanoscale*, 11(45), 21733–21739. doi:10.1039/c9nr09347h
22. Rupaimoole, R., & Slack, F. (2017). MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(3), 203–221. doi:10.1038/nrd.2016.246
23. Jorge, A., Pereira, E., Oliveira, C., Ferreira, E., Menon, E., Diniz, S., & Pezuk, J. (2021). MicroRNAs: understanding their role in gene expression and cancer. *Einstein*, 19, 1-7. doi:10.31744/einstein_journal/2021RB5996
24. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis,

- mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 402 (9), 1–12. doi:10.3389/fendo.2018.00402
25. Michlewski, G., & Cáceres, J. (2019). Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA*, 25(1), 1–16. doi: 10.1261/rna.068692.118
26. Yong, S., & Dutta, A. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 4, 199–227. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092222
27. Zhang, B., Pan, X., Cobb, G., & Anderson, T. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*, 302(1), 1–12. doi:10.1016/j.ydbio.2006.08.028
28. Lima, J., Cerqueira, L., Figueiredo, C., Oliveira, C., Cerqueira, L., & Oliveira, C. (2018). Anti-miRNA oligonucleotides : A comprehensive guide for design. *RNA Biology*, 15(3), 338–352. doi: 10.1080/15476286.2018.144595
29. Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 5451–5465. doi:10.1002/jcp.27486
30. Miroshnichenko, S., & Patutina, O. (2019). Enhanced inhibition of tumorigenesis using combinations of miRNA-targeted therapeutics. *Frontiers in Pharmacology*, 488 (10), 1–17. doi:10.3389/fphar.2019.00488
31. Shibata, C., Otsuka, M., Kishikawa, T., Yoshikawa, T., Ohno, M., Takata, A., & Koike, K. (2013). Current status of miRNA-targeting therapeutics and preclinical studies against gastroenterological carcinoma. *Molecular and Cellular Therapies*, 1(1), 5. doi:10.1186/2052-8426-1-5
32. Quemener, A. M., Bachelot, L., Forestier, A., David, E. D., & Galibert, G. M. (2020). The powerful world of antisense oligonucleotides : From bench to bedside. *WIREs RNA*, 1–22. doi: 10.1002/wrna.1594
33. Ramachandran, S., Ranjan, S., & Tathagata, S. (2022). Delivery Strategies for mRNA Vaccines. *Pharmaceutical Medicine*, 36(1), 11–20. doi:10.1007/s40290-021-00417-5
34. Liang, Y., Huang, L., & Liu, T. (2021). Development and Delivery Systems of mRNA Vaccines. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 1–10. doi:10.3389/fbioe.2021.718753
35. Chaudhary, N., Weissman, D., & Whitehead, K. A. (2021). mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nature Reviews*, 20, 817–838.

doi:10.1038/s41573-021-00283-5

36. Wang, Y., Zhang, Z., Luo, J., Han, X., & Wei, Y. (2021). mRNA vaccine : a potential therapeutic strategy. *Molecular Cancer*, 20 (1), 1–23. doi: 10.1186/s12943-021-01311-z
37. Samaridou, E., Heyes, J., & Lutwyche, P. (2020). Lipid Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery: Current Perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1-84 doi:10.1016/j.addr.2020.06.002
38. Hou, X., Zaks, T., Langer, R., & Dong, Y. (2021). Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nature Reviews Materials*, 6(12), 1078–1094. doi: 10.1038/s41578-021-00358-0
39. Miyoshi, K., Miyoshi, T., & Siomi, H. (2010). Many ways to generate microRNA-like small RNAs: Non-canonical pathways for microRNA production. *Molecular Genetics and Genomics*, 284 (2), 95–103. doi: 10.1007/s00438-010-0556-1.
40. BIONTECH (2021). **Next generation immunotherapy**. [Acedido a 22 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://investors.biontech.de/static-files/057be080-d0bd-4b58-8ad5-6acb6f7e421b>

Anexo I – PIPELINE DE VACINAS DE mRNA DA EMPRESA BioNTech PARA DOENÇAS INFECIOSAS E NA ÁREA ONCOLÓGICA⁴⁰

Infectious Diseases

Drug Class	Product Candidate	Indication (Targets)	Pre-clinical	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Commercial	Rights/Collaborator
mRNA	BNT162b2	COVID-19						Fosun Pharma (China), Pfizer (Global, excl. China)
	BNT161	Influenza (mod mRNA)						Pfizer
	Un-named program	Influenza (sa mRNA)						Pfizer
	Un-named program	Shingles						Pfizer
	Un-named program	Malaria						Fully-owned
	BNT164	Tuberculosis ¹						Bill & Melinda Gates Foundation
	Un-named program	HSV 2						Fully-owned
	Un-named program	HIV ¹						Bill & Melinda Gates Foundation
	Undisclosed programs	Additional mRNA vaccine programs ²						Fully-owned
	Undisclosed programs	Precision antibacterials						Fully-owned

Oncology

Drug Class	Platform	Product Candidate	Indication (Targets)	Pre-clinical	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Rights/Collaborator
mRNA	FixVac (fixed combination of shared cancer antigens)	BNT111	Advanced melanoma (Adjuvant & Metastatic)					Fully-owned
		BNT112	Prostate cancer					
		BNT113	HPV16+ head and neck cancer					
		BNT115	Ovarian cancer ³					
		BNT116	NSCLC					
	iNeST (patient specific cancer antigen therapy)	autogene cevumeran (BNT122)	1L melanoma					Genentech (global 50:50 profit/loss share)
			Adjuvant colorectal cancer					
	Intratumoral Immunotherapy	SAR441000 (BNT131)	Solid tumors (IL-12sc, IL-15sushi, GM-CSF, IFNα)					Sanofi (global profit/loss share)
	RiboMabs (mRNA-encoded antibodies)	BNT141	Multiple solid tumors (CLDN18.2)					Fully-owned
		BNT142	Multiple solid tumors (CD3+CLDN6)					
RiboCytokines (mRNA-encoded cytokines)	BNT151	Multiple solid tumors (Optimized IL-2)					Fully-owned	
	BNT152, BNT153	Multiple solid tumors (IL-7, IL-2)						