



UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA

João André dos Santos Rodrigues

**Relatório de Estágio orientado por Dra. Andreia Rocha e Monografia intitulada “Conceção, produção e aplicação de DNA e mRNA sintéticos em terapia génica” orientada pelo Professor Doutor Luís Pereira de Almeida referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.**

Setembro de 2023



FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DE  
**COIMBRA**

**João André dos Santos Rodrigues**

Relatório de Estágio sob a orientação da Dra. Andreia Rocha e Monografia intitulada “Conceção, produção e aplicação de DNA e mRNA sintéticos em terapia génica” sob a orientação do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida, referente à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

**Setembro de 2023**

Eu, João André dos Santos Rodrigues, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2016212567, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Conceção, produção e aplicação de DNA e mRNA sintéticos em terapia génica” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 8 de setembro de 2023.

---

(João André dos Santos Rodrigues)

## Agradecimentos

- Agradeço aos meus pais, pela educação, valores e princípios que sempre me transmitiram. Por acreditarem nas minhas capacidades e, ao longo de toda a minha vida, me terem proporcionado todas as oportunidades possíveis para que eu conseguisse atingir o meu sucesso, sem nunca desistirem de me acompanhar, mesmo nos momentos mais complicados.
- Agradeço à minha irmã, pela paciência e compreensão durante todos estes anos. Pela companhia durante o nosso crescimento e por continuamente me oferecer apoio, tanto nos momentos fáceis, como difíceis.
- Agradeço à Inês, por estar sempre ao meu lado, nunca desistindo de me motivar na conquista de todos os desafios que a vida proporciona. Sem ti, não só não conseguiria superar muitas das dificuldades que já superei, como o significado não seria tão rico.
- Aos meus grandes amigos, Nery, Salvado, Samuel e Supico, por todos os momentos de companheirismo ao longo destes anos. O valor da vossa amizade é incalculável.
- Ao Professor Doutor Luís Pereira de Almeida, pelo acompanhamento e valiosa orientação na redação da monografia.
- À Dra. Helena Amado e à Dra. Andreia Rocha, por me terem acolhido na farmácia Luciano & Matos de braços abertos e me terem mostrado o valor do exercício da profissão farmacêutica em farmácia comunitária.
- A toda a equipa da farmácia Luciano & Matos, cuja dedicação incessante na minha formação, não só me proporcionou uma excelente experiência de estágio, como sem dúvida me deixou preparado para desafios futuros.

A todos os que de alguma maneira me acompanharam durante o meu processo académico e que de alguma maneira me ajudaram a crescer, o meu mais sincero obrigado.

# Índice Geral

## Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	8
1. Introdução	9
2. Análise SWOT	10
2.1. Pontos Fortes	10
2.1.1. Acompanhamento e integração na equipa	10
2.1.2. Plano formativo do estágio	11
2.2. Pontos Fracos	12
2.2.1. Correlação do princípio ativo com designação comercial	12
2.2.2. Aconselhamento em Dermocosmética	12
2.3. Oportunidades	12
2.3.1. Formações	12
2.3.2. Largo espectro de serviços prestados	13
2.4. Ameaças	15
2.4.1. Rutura de medicamentos	15
3. Casos Práticos	15
3.1. Caso Prático 1	15
3.2. Caso Prático 2	16
3.3. Caso Prático 3	16
3.4. Caso Prático 4	17
3.5. Caso Prático 5	18
4. Considerações Finais	19
5. Referências Bibliográficas	20
6. Anexos	21

## Parte II – Monografia “Conceção, produção e aplicação de DNA e mRNA sintéticos em terapia génica”

Lista de Abreviaturas	28
Resumo	30
<i>Abstract</i>	31
1. Introdução	32
1.1 Relevância e Motivação	32
2. Terapia Génica: Princípios e Definições	33
2.1. DNA e RNA	33
2.2. Definição e princípios da terapia génica	33
2.3. Mecanismos de funcionamento da terapia génica	34
2.4. Tipos de abordagem à terapia génica – O papel de DNA e mRNA	34
3. Introdução a DNA e mRNA sintéticos	35
3.1. DNA sintético	36
3.1.1. DNA sintético – Síntese de Oligonucleótidos	36
3.1.1.1. Síntese de oligonucleótidos com base em coluna	37
3.1.1.2. Síntese de oligonucleótidos com base em microarranjo	40

3.1.2. Síntese do gene	44
3.2. mRNA sintético	46
3.2.1. <i>Design</i> e síntese de mRNA	47
3.2.1.1. <i>Design</i> de IVT mRNA	49
3.2.1.2. Síntese de IVT mRNA	50
4. Métodos de transferência de mRNA	53
4.1. Nanopartículas à base de lípidos (LNPs)	53
4.2. Nanopartículas à base de polímeros	54
4.3. Nanopartículas híbridas lípido-polímero (LPHNPs)	55
5. Aplicações de mRNA em terapia génica	55
5.1. IVT mRNA em terapias de substituição proteica	55
5.2. Vacinas de mRNA contra doenças infecciosas	56
5.3. Vacinas de mRNA para imunoterapia de cancro	57
6. Discussão	61
7. Referências Bibliográficas	64

# Parte I

## Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária



**Orientadora: Dra. Andreia Rocha**

**Fevereiro a Julho de 2023**

## **Lista de Abreviaturas**

**MICF** – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**PIM** – Preparação individualizada da Medicação

**SNS** – Sistema Nacional de Saúde



## I. Introdução

O farmacêutico é o especialista da área da saúde que se concentra no medicamento, desde a sua conceção até à dispensa e administração. A sua intervenção contribui para a prevenção e tratamento de doenças, através da prestação de cuidados de saúde diferenciados e da promoção do uso responsável de medicamentos. Deste modo, a carreira farmacêutica exige um elevado sentido de responsabilidade e ética, sendo que a formação e a constante atualização científica asseguram o cumprimento adequado do seu papel<sup>[1]</sup>.

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), com uma sólida formação académica, proporciona, ao futuro farmacêutico, um conjunto variado de recursos que o habilitam a desempenhar funções em qualquer área farmacêutica. Sendo que estas englobam as vertentes de Farmácia Comunitária, Farmácia Hospitalar, Análises Clínicas, Indústria Farmacêutica e Distribuição Grossista<sup>[2]</sup>. O curso de MICF serve como alicerce para uma formação especializada em cada uma das diversas atividades possíveis dentro desta profissão. Das várias áreas farmacêuticas, a farmácia comunitária apresenta-se como a vertente mais visível da profissão farmacêutica, devido ao fácil contacto com o utente<sup>[3]</sup>. Neste local de saúde, prestam-se vários serviços característicos da prática farmacêutica, como a dispensa de medicamentos, aconselhamento farmacêutico, apoio na utilização segura de medicamentos através de monitorização farmacoterapêutica e farmacovigilância, educação da população em matéria de saúde, preparação de medicamentos personalizados, medição de parâmetros bioquímicos e fisiológicos, administração de medicamentos, entre outros<sup>[1]</sup>.

O relatório em questão aborda o estágio curricular que ocorreu na “Farmácia Luciano & Matos”, durante o período de 1 de fevereiro de 2023 a 7 de julho de 2023, sob a supervisão e orientação da Dra. Andreia Rocha e sob a direção técnica da Dra. Helena Amado. A farmácia localiza-se na Rua da Sofia, em Coimbra, no entanto, devido a obras nas instalações principais da farmácia, o local onde decorreu o estágio trata-se de um local provisório na mesma rua. Relativamente a estas instalações provisórias, a Farmácia Luciano & Matos dispõe de uma área de atendimento ao público, dois gabinetes de atendimento personalizado, um laboratório, dois gabinetes de direção técnica, uma zona de receção de encomendas, várias zonas de armazenamento, instalações sanitárias e uma copa.

Durante este estágio, proporcionou-se a oportunidade de aplicar as competências profissionais adquiridas, enfrentando os desafios e responsabilidades inerentes à profissão farmacêutica. No decorrer do presente documento, elaborado sob a forma de análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), será apresentado, de forma crítica e objetiva, o processo de aprendizagem e a consolidação dos conhecimentos adquiridos durante o estágio

curricular, incluindo ainda, a exposição de cinco casos práticos, selecionados por enfatizarem a importância e o impacto da intervenção farmacêutica.

## 2. Análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*)

<b>Pontos Fortes – <i>Strengths</i></b>	<b>Pontos Fracos – <i>Weaknesses</i></b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Acompanhamento e integração na equipa</li> <li>▪ Plano formativo de estágio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Correlação do princípio ativo com designação comercial</li> <li>▪ Aconselhamento em dermocosmética</li> </ul>
<b>Oportunidades – <i>Opportunities</i></b>	<b>Ameaças – <i>Threats</i></b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Formações</li> <li>▪ Largo espectro de serviços prestados</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Rutura de medicamentos</li> </ul>

**Figura 1:** Análise SWOT do estágio na Farmácia Luciano & Matos.

### 2.1. Pontos Fortes

#### 2.1.1. Acompanhamento e integração na equipa

Ao longo do estágio, destacou-se a proximidade, disponibilidade e confiança demonstradas pelos colaboradores no processo da integração do estagiário. A farmácia Luciano & Matos conta com uma equipa de trabalho extremamente ativa e organizada. Esta equipa destaca-se, não só pela afabilidade, mas, acima de tudo, pela proatividade, dedicação e competência profissional. Além disso, a boa comunicação interpessoal e o trabalho de equipa presentes, são características essenciais na criação de um ambiente propício ao exercício da profissão farmacêutica. Existiu um constante empenho, por parte da equipa, manifestado através de uma participação ativa ao longo do estágio, fornecendo esclarecimentos no surgimento de dúvidas, facultando material de leitura e conferindo acesso a variadas formações. Este período formativo foi amplamente enriquecido pelo excelente ambiente de equipa existente, proporcionando uma constante oportunidade de adquirir a confiança necessária para a superação dos desafios emergentes e, conseqüentemente, para uma progressão positiva no estágio.

### 2.1.2. Plano formativo do estágio

O plano de formação que serviu de base para o estágio, permitiu a aquisição gradual das competências necessárias no domínio de todos os elementos essenciais para o bom funcionamento da farmácia. As novas tarefas foram introduzidas de forma progressiva, lógica e sequencial, permitindo a consolidação dos conhecimentos adquiridos e, conseqüentemente, a aquisição de autonomia na realização de cada tarefa. Inicialmente, procedeu-se a formação nas funções de *back office*, que incluíram a receção de encomendas, a verificação e correção de preços e datas de validade (quando necessário), o armazenamento com e sem a utilização de *robot* de farmácia e a organização dos produtos expostos ao público. Esta etapa destaca-se como particularmente importante, não só pelo contacto com os produtos existentes na farmácia, mas também pela primeira abordagem com as duas principais versões do *software* de gestão e atendimento da “*Global Intelligent Technologies*®” (Glintt®), o SIFARMA®.

Após o primeiro mês nas funções de *back office*, começou a transição para a área de atendimento ao público, onde, inicialmente, ocorre a observação de atendimentos e, eventualmente, onde se inicia a realização de atendimentos acompanhados por um elemento da equipa. De forma a garantir uma boa preparação para o momento do atendimento, foram facultados protocolos de intervenção farmacêutica com esquemas de atuação e, ainda, foi dada formação relativa ao sistema de faturação dos vários tipos de receitas, organismos de comparticipação e gestão de estupefacientes e psicotrópicos. Rapidamente foi adquirida a autonomia no atendimento ao público. No entanto, sempre com a proximidade de membros da equipa que, a qualquer momento, auxiliavam na resolução de qualquer dúvida que fosse surgindo.

O plano de estágio terminou com uma semana de observação no laboratório de medicamentos manipulados, onde se proporcionou a oportunidade de contactar com o *software* específico de gestão de laboratório, que a farmácia Luciano & Matos utiliza no dia-a-dia na produção de todos os medicamentos manipulados. Durante este período ocorreu a observação da conceção de vários medicamentos manipulados com as mais variadas formas farmacêuticas e, ainda, foi proporcionada a oportunidade de, na qualidade de estagiário, proceder à produção de um medicamento manipulado, na forma de cápsulas de minoxidil 1,5mg (Anexo I-6).

O plano de estágio está estruturado de forma a permitir que o estagiário adquira a capacidade de realizar toda a gama de tarefas de maneira adequada, segura e independente.

## **2.2. Pontos Fracos**

### **2.2.1. Correlação do princípio ativo com designação comercial**

Durante todo este percurso, uma das componentes mais desafiantes apresentou-se na familiarização dos nomes comerciais correspondentes aos medicamentos. Não necessariamente por causa da dificuldade do reconhecimento e associação dos nomes comerciais ao respetivo princípio ativo, mas porque existe uma pressão intrínseca, durante o atendimento ao público, em dar uma resposta rápida e clara ao utente. Esta dificuldade traduz-se num maior tempo gasto de atendimento e na dificuldade de resposta rápida às diversas perguntas dos utentes, correndo o risco de comprometer a confiança destes para com a capacidade de esclarecimento do estagiário. No entanto, devido ao contacto prévio com vários medicamentos, através do contacto repetido e com o auxílio da equipa e do sistema informático, esta dificuldade acabou por ser rapidamente ultrapassada.

### **2.2.2. Aconselhamento em Dermocosmética**

No decorrer do período de estágio, o maior desafio a ultrapassar manifestou-se em aconselhamento de produtos de dermocosmética. Apesar das várias formações disponibilizadas e do apoio incessante da equipa na partilha de informação, a quantidade e variedade de marcas e produtos cosméticos apresentados em embalagens praticamente semelhantes, apresentaram-se como o maior desafio na área de atendimento ao público. Ao contrário do que acontece com a designação comercial de medicamentos, o contacto com marcas de dermocosmética sempre foi limitado, agravando o tempo de adaptação á vasta gama de produtos. Esta dificuldade não terá sido totalmente ultrapassada, mas existiu uma melhoria significativa na agilidade de recomendações de dermocosmética. Desta forma, com experiência futura naquele que é um percurso de aprendizagem contínua em farmácia comunitária, também se tornará, inevitavelmente, num desafio superado.

## **2.3. Oportunidades**

### **2.3.1. Formações**

Um dos compromissos fundamentais do farmacêutico é manter um nível de competência apropriado à sua atividade profissional. Desta forma, a formação contínua é um componente essencial da carreira farmacêutica.

No decorrer do estágio, foram disponibilizadas várias ações formativas, destacando as da La Roche Posay®, Eucerin® e Ezfy®. Tendo estas sido úteis no primeiro contacto com

determinados produtos, no caso das da La Roche Posay® e da Eucerin®, e numa melhor compreensão dos vários programas de acompanhamento compreendidos pelos serviços Ezfy®. Este tipo de formação contínua provou-se extremamente útil para uma rápida integração na dinâmica proativa da equipa e na familiarização com os vários produtos e serviços que são trabalhados na Farmácia Luciano & Matos.

### **2.3.2. Largo espectro de serviços prestados**

A Farmácia Luciano & Matos dispõe de uma ampla gama de serviços de apoio ao utente, nomeadamente a medição de parâmetros bioquímicos (índice de glicemia, colesterol total, pressão arterial), administração de injetáveis e vacinas, serviço de podologia, serviço de nutrição, preparação individualizada da medicação (PIM), entrega ao domicílio de medicamentos, serviços compreendidos pelos programas Ezfy® e preparação de medicamentos manipulados.

Os serviços de medição de parâmetros bioquímicos, assim como os serviços de podologia, nutrição e administração de injetáveis e vacinas, foram tipicamente efetuados nos gabinetes de atendimento personalizado. Tanto o serviço de nutrição como de podologia, decorrem em parceria com profissionais especializados e certificados na área mediante marcação prévia. Já a administração de injetáveis e vacinas, é realizada apenas pelos farmacêuticos com certificação necessária para essa função. Quanto aos serviços de medição de parâmetros bioquímicos, estes podem ser prestados por qualquer elemento integrante da equipa com habilitações de atendimento ao público, incluindo o estagiário.

A Preparação Individualizada da Medicação (PIM) é um serviço farmacêutico que consiste na organização de medicamentos sólidos orais em dispositivos, como caixas dispensadoras ou alvéolos, de forma individualizada para melhorar a adesão terapêutica, aumentando a segurança e eficácia dos tratamentos farmacoterapêuticos do doente<sup>[4]</sup>. PIM é um serviço que pode ser prestado em farmácias comunitárias, de acordo com a Portaria nº 97/2018, de 28 de março, que regula o exercício da atividade de preparações individualizadas de medicamentos<sup>[5]</sup>. Este serviço é indicado para doentes polimedicados, especialmente aqueles com doenças crónicas, ou com dificuldades em gerir a medicação. A PIM pode ajudar a melhorar a adesão à terapêutica, pois facilita a identificação dos medicamentos, a dosagem correta e o horário de administração. O serviço é prestado pelo farmacêutico, sendo que este é responsável por verificar a prescrição médica, preparar a medicação de acordo com as necessidades do utente e fornecer orientações sobre a administração da medicação. Durante o estágio, proporcionou-se a oportunidade de, não só observar todo o circuito de preparação

de PIM, mas também de auxiliar em processos de organização do *stock* dedicado a este serviço, limpeza e montagem da tecnologia e abordar o *software* proprietário que permite o funcionamento de toda a maquinaria envolvida.

A entrega ao domicílio de medicamentos é um serviço que pode ser prestado em farmácias comunitárias, de acordo com o Decreto-Lei n.º 307/2007, de 31 de agosto<sup>[6]</sup> e a Portaria n.º 1427/2007, de 2 de novembro<sup>[7]</sup>. Este serviço é principalmente indicado a utentes com dificuldade de deslocação à farmácia, como idosos, pessoas com mobilidade reduzida ou doentes crónicos. O serviço de entrega ao domicílio de medicamentos é prestado pelo farmacêutico, que é o responsável por verificar a prescrição médica, preparar a medicação e entregá-la ao utente.

Os programas Ezfy<sup>®</sup> são serviços de saúde prestados por farmacêuticos comunitários, com o objetivo de melhorar a adesão à terapêutica, a segurança e a eficácia dos tratamentos farmacológicos. Os programas Ezfy<sup>®</sup> são personalizados, de acordo com as necessidades de cada utente e incluem uma variedade de serviços, tais como a monitorização da adesão à terapêutica, acompanhamento farmacoterapêutico e educação em temáticas relacionadas com saúde. Durante o estágio, surgiu a oportunidade de participar em diversas formações relativas aos vários programas de acompanhamento desenvolvidos pela Ezfy<sup>®</sup>. Além disso, no momento de atendimento ao público, houve, também, a oportunidade de proceder à inscrição de vários utentes nesses mesmos programas e, mais tarde, proceder ao devido acompanhamento, tanto por meio telefónico, como presencialmente.

Os medicamentos manipulados correspondem a qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico<sup>[8]</sup>. Estes são tipicamente preparados na farmácia, de acordo com uma prescrição médica. Os medicamentos manipulados podem ser preparados em diferentes formas farmacêuticas, como comprimidos, cápsulas, soluções orais, suspensões, pomadas, cremes, entre outros. Este serviço destina-se a satisfazer necessidades do público que não sejam atendidas pelo mercado farmacêutico. Conforme descrito no ponto 2.1.2., durante a última semana do estágio, surgiu a oportunidade de proceder à conceção de um medicamento manipulado, assim como todos os registos e os devidos procedimentos de controlo de qualidade. Este processo foi acompanhado pela porção da equipa que tipicamente se dedica ao laboratório a tempo inteiro.

## **2.4. Ameaças**

### **2.4.1. Rutura de medicamentos**

A rutura de medicamentos é uma situação preocupante na perspetiva de um farmacêutico, pois pode ter várias implicações negativas, tanto para os utentes, como para a farmácia em si.

Durante o estágio, surgiram vários cenários em que houve falta de fornecimento de medicamentos de diferentes laboratórios, com níveis variados de gravidade, sendo que para algumas destas situações, existiam alternativas terapêuticas disponíveis de laboratórios diferentes. O caso mais preocupante terá sido a rutura de stock de Ozempic®. Este medicamento, comparticipado pelo SNS para o tratamento de diabetes, sofreu de uma procura exacerbada devido á sua utilização *off-label* para perda de peso.

Não tendo sido o único medicamento em rutura, surgiu a necessidade de se criar uma lista de espera para vários medicamentos. Á medida que ia sendo libertado stock para a farmácia, iam-se contactando telefonicamente os utentes que tinham demonstrado interesse em ser colocados em lista de espera, mediante a apresentação de receita médica (quando aplicável).

## **3. Casos Práticos**

### **3.1. Caso Prático I**

Mulher, americana a viver em Portugal há menos de um ano, na faixa etária dos 50 anos, recorre á farmácia no sentido de obter um xarope para a tosse. Perante a situação, desenvolve-se uma conversa no sentido de compreender o tipo de tosse e qual a possível origem do problema. Em conversa com a utente, conclui-se que esta sofria de uma tosse seca que tinha começado 4 dias antes da ida á farmácia. Tendo em conta que o início do sintoma coincidia com um aumento significativo dos níveis de pólen na atmosfera que ocorria no mês de maio, foi sugerido que a utente não levasse o xarope para a tosse. Em vez disso, após a garantia de que a utente não apresentava nenhuma hipersensibilidade conhecida a cloridrato de fexofenadina, propôs-se que experimentasse Telfast® 120 mg, tomando 1 comprimido por dia, durante os 5 dias seguintes, de forma a denotar se haveria melhoria dos sintomas. A utente aceitou a proposta e de seguida procedeu-se á explicação de que poderia surgir alguma sonolência durante o período que se encontrar a tomar o medicamento. Passado um mês, a utente retorna á farmácia, por motivos não relacionados com a primeira visita. Questionou-se se a estratégia adotada teria tido sucesso, pelo que a resposta foi positiva. Este caso prático,

elucida a importância da capacidade de correlação de vários factores na análise de um determinado problema, por parte do farmacêutico, desta forma permitindo que este tenha a capacidade de tratar o problema subjacente a uma determinada situação, ao contrário de apenas corrigir o sintoma.

### **3.2. Caso Prático 2**

Mulher, na faixa etária dos 60 anos com sobrepeso, visita a farmácia em busca da medicação habitual. Em conversa com a utente, esta recorda-se de que tinha recebido resultados de análises de rotina há algum tempo e questiona se estas poderiam ser vistas na farmácia, de forma a garantir que estava tudo conforme o desejado, sendo que não demonstrava intenção de ir ao médico num período de tempo próximo. Ao analisar as análises, denota-se que estava quase tudo dentro de limites aceitáveis, no entanto dois valores destacaram-se como potencialmente problemáticos. Os valores de glicémia em jejum e da hemoglobina glicada estavam particularmente elevados, sendo que os níveis de glicémia em jejum se encontravam acima dos 250 mg/dL e os níveis de hemoglobina glicada entre 7,5 e 8. Sem adotar uma postura alarmista, questionou-se à utente se esta sofria de diabetes, ao que responde que, embora tivesse vários casos na família, não tinha diabetes. Foi recomendado à utente que, assim que tivesse oportunidade, se dirigisse ao médico e mostrasse esses valores, pois existia possibilidade de ela ter desenvolvido diabetes desde a última vez que fez análises. Foi explicado que diabetes não é uma doença incomum nem tão debilitante quanto o público comum acredita. Com a medicação adequada e algumas alterações no estilo de vida, é possível seguir uma vida perfeitamente normal. Desde então a utente voltou à farmácia, mas ainda não teria conseguido agendar uma consulta, devido aos constrangimentos atuais do Sistema Nacional de Saúde (SNS), sendo que foi reforçada a importância de não desistir de conseguir uma consulta. Entretanto o período de estágio deu-se como terminado e, embora neste momento não se consiga saber o desfecho deste caso, este caso clínico reforça a importância do contacto e da proximidade do farmacêutico com o utente.

### **3.3. Caso Prático 3**

Homem, na faixa etária dos 50 anos, visita a farmácia com o objetivo de adquirir Cialis® e refere que foi um médico que lhe é próximo que recomendou a toma e, adicionalmente, que seria a primeira vez que iria tomar este medicamento. Em conversa com o utente, conclui-se que este carece da receita médica para a aquisição do produto. A partir deste momento fica decidido que não se irá proceder com a cedência do medicamento, no entanto, sendo a



primeira vez que o utente iria recorrer a este tipo de medicação, antes de negar a venda, fomenta-se um diálogo com o utente no sentido de compreender mais sobre o caso. Desta forma, podendo surgir a oportunidade de aconselhamento farmacêutico útil sem que o utente fique desmotivado na partilha de informação. Eis que, no decorrer do diálogo surge que o utente sofre de problemas cardiovasculares e que se encontra a tomar medicação, que embora não se tenha lembrado do nome em concreto do medicamento, sabe que é para o coração. Dado este cenário, foi desaconselhada a toma de Cialis®, pelo que existe a possibilidade deste tipo de medicamento influenciar os problemas cardiovasculares presentes e, até mesmo, interagir com a medicação que toma. O utente apercebe-se que não será cedido o medicamento que procura, a postura altera-se e, no fim, sorrindo, denota que “se não será vendido ali, será noutra farmácia”. Embora este caso não tenha tido um final totalmente positivo, é importante reforçar a importância do interesse do farmacêutico no utente. Certamente que, neste caso, se poderia simplesmente negar a venda a partir do momento que se constata a falta da receita médica. No entanto, a criação de um diálogo e uma investigação mais cuidada e preocupada sobre um determinado cenário, pode levar a oportunidades de educação da população na matéria da saúde. Nem todos os membros do público iram responder positivamente às direções que o farmacêutico propõe, no entanto é imprescindível que este nunca deixe de estabelecer um diálogo e de partilhar informações pertinentes sobre os produtos de saúde.

#### **3.4. Caso Prático 4**

No decorrer do estágio, surgiram várias situações onde o público demonstra um determinado nível de iliteracia relativamente aos métodos contraceptivos. Embora a maioria dos acontecimentos tenham ocorrido com utentes de faixas etárias jovens (na casa dos 20-30 anos), o desconhecimento em relação a métodos contraceptivos é transversal à idade.

Mulher, na faixa etária dos 20 anos, recorre à farmácia com o objetivo de obter a dispensa de contraceção oral de emergência. Sendo a utente do sexo feminino e o tema caracteristicamente sensível, é questionado se se sentiria mais confortável em ser atendida por uma mulher, ao que responde que não lhe faz diferença. Perante a situação, recolhe-se mais informação sobre a motivação pela procura deste método contraceptivo. Tenta-se saber há quanto tempo aconteceu a relação sexual, se utiliza algum método contraceptivo hormonal ou não hormonal e quando teria sido a última menstruação. Conclui-se que a relação sexual teria acontecido há menos de 24h sem a utilização de qualquer método contraceptivo, no entanto demonstrou interesse em iniciar a toma de uma pílula, perguntando qual a que seria

mais recomendada. Frente a esta questão, é explicado que cada pílula tem características diferentes e que devem ser escolhidas conforme as características individuais de cada mulher. Dessa forma, o mais indicado seria tentar conseguir uma consulta de planeamento familiar ou de ginecologia, para que lhe seja recomendada uma pílula contraceptiva adequada às suas características pessoais. Tendo em conta que a relação sexual teria ocorrido num prazo inferior a 24 horas, é recomendada a toma de Levonorgestrel 1,5 mg, de nome comercial Norlevo<sup>®</sup>, alertando para os potenciais efeitos secundários. Alerta-se ainda que, no caso de vômitos ou diarreia num período após as 3 horas da toma, teria de repetir a toma. Adicionalmente, alerta-se que o método contraceptivo de emergência, como o nome indica, deve ser reservado apenas para emergências e que não deve ser utilizado de maneira regular. Por fim, é reforçada a importância dos métodos contraceptivos de barreira durante as relações sexuais.

Todos os atendimentos relacionados com a contraceção de emergência apresentam uma oportunidade para a promoção de literacia do público relativamente ao tema da contraceção. Este caso prático, ilustra, novamente, a importância do papel do farmacêutico na educação da população na matéria da saúde.

### **3.5. Caso prático 5**

Homem, na faixa etária dos 40 anos, dirige-se á farmácia com o objetivo de encontrar algum produto que auxilie no controlo de diarreia que teria surgido dois dias antes. Frente a este cenário é questionado que tipo de alimentos teria consumido nos dias anteriores, se teria viajado recentemente, se havia ocorrência de náuseas ou vômitos e se teria sentido febre. O utente não viajou, não ingeriu alimentos fora da sua alimentação comum, não apresenta náuseas, vômitos nem febre. Desta forma, foi recomendada a toma de UL-250<sup>®</sup> até 3 vezes ao dia, com objetivo de reestabelecer o balanço intestinal, o consumo de grandes quantidades de água, evitando a desidratação e uma alimentação leve durante os dias seguintes. Tendo em conta que a maior parte dos casos de diarreia se trata de ocorrências autolimitadas, recomendou-se que, caso o cenário de diarreia não ficasse resolvido nos próximos 3 dias, se dirigisse a uma consulta médica, para que se consiga avaliar e diagnosticar a situação.

Esta situação ilustra a importância da farmácia como um recurso acessível para obter informações e produtos para o tratamento de problemas de saúde comuns. Mesmo em casos simples, como a diarreia, o farmacêutico desempenha um papel fundamental na orientação de soluções adequadas.

#### **4. Considerações Finais**

O estágio curricular em farmácia comunitária é, indiscutivelmente, uma componente vital do plano de estudos de MICEF, oferecendo uma oportunidade inestimável para a consolidação dos conhecimentos técnicos e científicos adquiridos durante o curso. Gradualmente, foi adquirida autonomia na execução de diversas tarefas inerentes à profissão. Este período de formação reforça ainda, a importância do papel do farmacêutico como prestador de cuidados de saúde. Para o desempenho eficaz das funções em farmácia comunitária, demonstrou-se essencial a aplicação dos conhecimentos e competências adquiridos ao longo do curso de MICEF.

Gostaria de reforçar um profundo agradecimento a toda a equipa da Farmácia Luciano & Matos, pela dedicação à minha formação, pela integração na equipa, pelo apoio constante e por toda a confiança depositada em mim.

## 5. Referências Bibliográficas

- [1] Ordem dos Farmacêuticos. A Farmácia Comunitária. [Consultado a 21 de agosto de 2023]. Disponível em <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>
- [2] Ordem dos Farmacêuticos. [Consultado a 5 de setembro de 2023]. Disponível em <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/>
- [3] Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. [Consultado a 21 de agosto de 2023]. Disponível em [https://apps.uc.pt/courses/PT/programme/1172/2022-2023?id\\_branch=21781](https://apps.uc.pt/courses/PT/programme/1172/2022-2023?id_branch=21781)
- [4] Ordem dos Farmacêuticos. Norma Geral Preparação Individualizada da Medicação (PIM). Nº 30-NGE-00-010-02 | P I / 21, 9-10-2018. [consultado a 5 de setembro de 2023].
- [5] PORTARIA N.º 97/2018 DE 9 DE ABRIL. Diário da República, 1.ª série — N.º 69 — 9 de abril de 2018, p. 1077. [Consultado a 5 de setembro de 2023].
- [6] MINISTÉRIO DA SAÚDE. Regulamento do Exercício da Atividade Farmacêutica. Diário da República, 1.ª série — N.º 168 — 2007-08-31, pp. 6083-6091.
- [7] INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. (Infarmed). Portaria n.º 1427/2007, de 2 de novembro. [Consultado a 5 de setembro de 2023].
- [8] MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria n.º 594/2004, de 2 de junho. Diário da República, 1.ª série — N.º 129 — 2004-06-02, pp. 3441-3445.



## Ficha de Preparação

6615

### Minoxidil

Forma farmacêutica: Cápsulas

Data de Preparação: 06-07-2023

Nº Lote: 202307028

Quantidade: 1 x 61

Prazo de Utilização: 06-01-2024

Cor: Vermelha

Vermelha

Transparência: NA

Odor: Inodoras

Inodoras

pH: NA

Monografia: Cápsulas

Conforme

Qt. Final (+/- 5%)

61 unid

61 unid

Uniformidade de massa (mg)

120 126 124 124 123 121 119 115 116 129 122 117 124 123 121 128 117 118 122 119

Resultado CQ: **Aprovado**

Hora/Data: 06-07-2023 16:49:01

Operador UM:

Observações:

Cálculo do Preço:

Forma Farmacêutica	F	Factor	Limite	Factor adicional	Manipulação	Sub-Total
Cápsulas	5,52	4,5	50	0,01	25,45 €	27,76 €
PVP calculado ao abrigo da Portaria nº 769/2004 de 1 de Junho						
	Iva	6 %	Preço sem IVA:	36,09 €	PVP*:	<b>38,25 €</b>

Operador:

Supervisor:

Registado por:

Libertado por:

Data Libertação:



\*6615\*

Anexo 2: Ficha de Preparação de 60 cápsulas de minoxidil (Página 2 de 2).

Medicamento: Cápsulas Minoxidil 1,5mg

Teor em substância(s) activa(s): 100g (ml ou unidades) contém 0,0015 g (ml) de Minoxidil.

Forma farmacêutica: Cápsula

Data de preparação: 6/7/2023

Número de lote: 202307028

Quantidade a preparar: 60 caps

Matérias-primas	Nº de lote	Origem	Farmacopeia	Quantidade para 100g	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Rubrica operador	Rubrica supervisor
Minoxidil	<u>225479-31</u>	<u>Acofarma</u>	<u>Minoxidil</u>	<del>0,0015</del>	<del>0,09178</del>	<del>0,0919</del>	<u>JR</u>	
Riboflavina	<u>0118650</u>	<u>Guinama</u>	<u>Ribofl USP</u>	<del>0,061</del>	<del>0,061g</del>	<del>0,0615</del>	<u>JR</u>	
Diluap SLD	<u>201102-107</u> <u>230715</u>	<u>Fagion</u>	<u>Fagion</u>	<del>4,31985</del>	<del>4,31985g</del>	<del>4,3208</del>	<u>JR</u>	
Cápsulas nº3 vermelhas	<u>224608-03</u> <u>3</u>	<u>Acofarma</u>	<u>PhEuz</u>	<del>60 caps</del>	<del>2,85g</del>	<del>2,85g</del>	<u>JR</u>	

7320

**Preparação**

	Rubrica do operador
1. Verificar o estado de limpeza do material.	<u>JR</u>
2. Reduzir a tenidades semelhantes os componentes da mistura de pós, caso se aplique.	<u>JR</u>
3. Pesar os pós.	<u>JR</u>
4. Misturar os pós.	<u>JR</u>
5. Após obtenção de uma mistura homogénea, proceder ao enchimento volumétrico dos invólucros previamente selecionados.	<u>JR</u>
6. Acondicionar, fechar o recipiente e rotular.	<u>JR</u>
7. Lavar e secar o material utilizado.	<u>JR</u>

Aparelhagem usada: Balança (BLOS), Encapsulador manual, Galina Top.

**Embalagem**

Tipo de embalagem: Frasco Plástico Capacidade do recipiente: 100ml

Material de embalagem	Nº de lote	Origem
<u>HDPE/LDPE</u>	<u>170303</u>	<u>Aofarma</u>
<u>-</u>	<u>-</u>	<u>-</u>

Operador: JR.

**Prazo de utilização e Condições de conservação**

Condições de conservação: ~~Conservar à temperatura ambiente~~ Conservar à temperatura ambiente na embalagem bem fechada

Operador: JR.

Prazo de utilização: 6 meses.

Operador: JR.

**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	<b>DENOMINAÇÃO DO MEDICAMENTO</b>	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 fora do alcance das crianças Advertências (precauções de manuseamento, etc.) Uso externo (caso se aplique) (em fundo vermelho)

Operador: JR.



Verificação

ENSAIO	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO	Rubrica do operador
Cor	ligeiramente Amarelado	Conforme.	JR.
Odor	Inodoro	Conforme.	JR.
Aspecto	Homogeneo.	Conforme.	JR.
Ensaio uniformidade de massa	HP 9.0	Conforme.	JR.
Quantidade	60 caps.	Conforme.	JR.

Aprovado  Rejeitado

Supervisor: \_\_\_\_\_ 6/7/23

Nome e morada do doente

[Redacted]

Nome do prescriptor

[Redacted]

Anotações

Só foram preparadas 60 caps. pois o utente tem consulta em prazo de 2 meses e poderá ser ajustada a dosagem.

Anexo 5: Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados (Página 3 de 4).

Cálculo do preço de venda

MATÉRIAS-PRIMAS:

Matérias-primas	Embalagem existente em armazém		Preço de aquisição de uma dada quantidade unitária (sem IVA)		Quantidade a usar	Fator multiplicativo	Preço da matéria-prima utilizada na preparação
	Quantidade adquirida	Preço de aquisição (s/ IVA)	Quantidade unitária	preço			
Minoxidil	100g	23,81 €	1g	0,2381 €	x 0,09178	x 2,8	= 0,06 €
Riboflavina	250g	63,74 €	1g	0,25496 €	x 0,061	x 2,8	= 0,04 €
Dilucap SLD	1000g	40,30 €	1g	0,0403 €	x 2,31985	x 2,2	= 0,19 €
Cápsulas nº3 vermelhas	5000 caps → 240g	45,71 €	1g	0,1905 €	x 2,8	x 1,9	= 1,042 €
<b>Total Matéria-Prima (A)</b>							<del>1,92</del> 1,92

HONORÁRIOS DE MANIPULAÇÃO:

	Forma Farmacéutica	Quantidade	F (€)	Fator multiplicativo	Valor
Valor referente à quantidade base	<del>50</del> Cápsulas	50	5,52	x 4,5	24,84 €
Valor adicional		10	x 5,52	x 0,01	0,552 €
<b>Total da Manipulação (B)</b>					25,39 €

MATERIAL DE EMBALAGEM: Frasco Plástico 100ml L.

Material de embalagem	Preço de aquisição	Quantidade	Fator multiplicativo	Valor
Frasco Plástico 100ml	0,65 €	x 1	x 1,2	= 0,78 €
-	-	-	-	= - €
<b>Total de Material de Embalagem (C)</b>				= 0,78 €

P. V. P. DO MEDICAMENTO MANIPULADO:

Soma de (A) + (B) + (C)	Fator multiplicativo	Valor
28,09 €	x 1,3	= 36,52 €
	I. V. A.	= <del>38,70</del> 2,19 €
	PVP	= 38,70 €

Operador: JP

Supervisor: \_\_\_\_\_

## **Parte II**

### **Monografia**

**“Conceção, produção e aplicação de DNA e mRNA  
sintéticos em terapia génica”**

**Orientador: Professor Doutor Luís Pereira de Almeida**

## Lista de Abreviaturas

- ADA** – *Adenosine deaminase* (Em português: Adenosina desaminase)
- ATP** – *Adenosine triphosphate* (Em português: trifosfato de adenosina)
- ATTR** – *Transthyretin Amyloidosis* (Em português: Amiloidose de transtirretina)
- Cas9** – *CRISPR associated protein 9* (Em português: Proteína 9 associada a CRISPR)
- COVID-19** – *Coronavirus disease 2019* (Em português: Doença provocada por coronavírus 2019)
- CPP** – *Cell-penetrating peptides* (Em português: Péptido de penetração celular)
- CRISPR** – *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (Em português: Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas)
- CTP** – *Cytidine triphosphate* (Em português: Citidina trifosfato)
- DMD** – *Digital Micromirror Device* (Em português: Aparelho digital de microespelhos)
- DMT** – *Dimethoxytrityl* (Em português: Dimetoxitritil)
- DNA** – *Deoxyribonucleic acid* (Em português: Ácido desoxirribonucleico)
- dsDNA** – *Double-stranded DNA* (Em português: DNA de cadeia dupla)
- FDA** – *Food and Drug Administration*
- GTP** – *Guanosine triphosphate* (Em português: Trifosfato de guanosina)
- HIV** – *Human Immunodeficiency Virus* (Em português: Vírus da imunodeficiência humana)
- HPLC** – *High-performance liquid chromatography* (Em português: cromatografia líquida de alta eficiência)
- HPV** – *Human Papillomavirus* (Em português: Vírus do papiloma humano)
- IVT** – *In Vitro Transcription* (Em português: transcrição *in vitro*)
- LNPs** – *Lipid Nanoparticles* (Em português: Nanopartículas lipídicas)
- LPHNPs** – *Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles* (Em português: Nanopartículas Híbridas Lípido-Polímero)
- LTR** – *Long terminal Repeat* (Em português: Repetições terminais longas)
- m7G** – 7-Metilguanosina

**mRNA** – *Messenger-RNA* (Em português: RNA mensageiro)

**NTP** – *Nucleoside triphosphate* (Em português: Nucleosídeo trifosfato)

**ORF** – *Open Reading Frame* (Em português: Fase de leitura aberta)

**PABP** – *poly-A-binding protein* (Em português: Proteína de ligação poli-A)

**PCR** – *Polymerase chain reaction* (Em português: Reação em cadeia da polimerase)

**PEI** – Polietilenimina

**PGH** – Projeto Genoma Humano

**PPG** – *Photolabile 5' protecting groups* (Em português: Grupos de proteção fotolábeis 5')

**RNA** – Ácido ribonucleico

**SARS-CoV-2** – *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (Em português: Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2)

**SCID** – *Severe Combined Immunodeficiency* (Em português: Imunodeficiência combinada grave)

**SIDA** – Síndrome da imunodeficiência adquirida

**siRNA** – *Small interfering RNA* (Em português: RNA de Interferência Curto)

**TdT** – *terminal desoxynucleotidil transferase* (Em português: Desoxinucleotidil-transferase terminal)

**TLRs** – *Toll like Receptor* (Em português: Recetor tipo toll)

**tRNA** – *Transfer ribonucleic acid* (Em português: RNA de transferência)

**UTP** – *Uridine triphosphate* (Em português: Trifosfato de uridina)

**UTR** – *Untranslated Region* (Em português: Região não traduzida)

## Resumo

Em 1990, foi proposto o projeto do genoma humano (PGH), com o objetivo de sequenciar e mapear o genoma humano. Desde então, emergiram vários estudos relacionados com terapia gênica. Esta terapêutica é uma abordagem inovadora, que visa corrigir as causas subjacentes de uma ampla variedade de doenças, através da introdução de genes terapêuticos nas células do doente, desencadeando a produção de proteínas específicas, a substituição de genes defeituosos ou a desativação de genes problemáticos.

A terapia gênica baseia-se na compreensão profunda da biologia molecular e genética humana e no desenvolvimento de técnicas avançadas que permitem a manipulação e entrega de material genético. A produção de DNA e mRNA (RNA mensageiro) seja por métodos biotecnológicos seja por síntese química, emerge como um passo fundamental em terapia gênica, sendo que fornece uma ferramenta essencial para o desenvolvimento de abordagens específicas na resolução de diversas condições de saúde.

Apesar de enfrentar desafios complexos, a terapia gênica carrega um potencial de impacto enorme, prometendo revolucionar completamente o paradigma de tratamento de inúmeras afeções de saúde. No entanto ainda existem alguns desafios significativos, incluindo a eficácia a longo prazo, a segurança das abordagens utilizadas e a complexidade e custo associado, aos processos biotecnológicos em que se recorre a células para a produção de ácidos nucleicos.

Em alternativa aos processos biotecnológicos têm vindo a emergir os processos síntese química na produção de DNA e mRNA sintéticos que no decorrer da presente monografia, serão explorados. Serão ainda abordados os principais métodos de entrega e aplicações de mRNA sintético.

**Palavras-chave:** Terapia gênica, DNA sintético, mRNA sintético, Conceção, Aplicações

## **Abstract**

In 1990, the Human Genome Project (HGP) was proposed with the aim of sequencing and mapping the human genome. Since then, several studies related to gene therapy have emerged. This therapy is an innovative approach that seeks to correct the underlying causes of a wide variety of diseases by introducing therapeutic genes into the patient's cells, triggering the production of specific proteins, replacing defective genes, or deactivating problematic genes.

Gene therapy is based on a deep understanding of molecular biology and human genetics, as well as the development of advanced techniques that enable the manipulation and delivery of genetic material. The production of DNA and mRNA (messenger RNA), whether through biotechnological methods or chemical synthesis, is emerging as a crucial step in gene therapy, providing an essential tool for the development of targeted approaches to addressing various health conditions.

Despite facing complex challenges, gene therapy carries enormous impact potential, promising to completely revolutionize the treatment paradigm for numerous health conditions. However, there are still some significant challenges, including long-term efficacy, the safety of the approaches used, and the complexity and cost associated with biotechnological processes that rely on cells for the production of nucleic acids.

As an alternative to biotechnological processes, chemical synthesis processes for producing synthetic DNA and mRNA have been emerging, which will be explored in the course of this monograph. The main methods of delivery and applications of synthetic mRNA will also be addressed.

**Keywords:** *Gene Therapy, Synthetic DNA, Synthetic mRNA, Conception, Applications.*

## I. Introdução

### I.1. Relevância e Motivação

O projeto Genoma Humano (PGH) é um dos marcos mais importantes da história científica. O projeto, liderado por um grupo internacional de investigadores, foi lançado em 1990 e tinha como objetivo sequenciar e mapear o genoma humano. Concluído em 2003, este provou-se um sucesso, sendo que pela primeira vez se estabeleceu a maior parte das sequências codificantes de proteínas<sup>[1]</sup>. Desde que este projeto foi proposto, surgiram vários estudos relacionados com terapia génica e, em 1990, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprova o primeiro ensaio clínico para tratamento de uma imunodeficiência recessiva rara, a deficiência na adenosina desaminase (ADA) que provoca uma doença denominada de imunodeficiência combinada grave (SCID). Esta doença é caracterizada pela falta ou alteração do gene responsável pela síntese da enzima ADA, uma enzima crucial para o funcionamento do sistema imunitário, sendo que a sua função é imprescindível para o desenvolvimento e maturação de linfócitos T e B<sup>[2]</sup>. Neste ensaio clínico, ocorreu a recolha de células T a partir do sangue dos doentes e, posteriormente, foram estimuladas a proliferar em cultura e transduzidas com um vetor retroviral que continha uma cópia funcional do gene de ADA. Após a reintrodução no corpo humano, o número de linfócitos T no sangue normalizou, tal como várias respostas imunitárias. O tratamento foi interrompido após dois anos, mas a expressão do gene ADA nos linfócitos T, persistiu<sup>[3]</sup>. O sucesso deste procedimento vem solidificar a terapia génica como uma terapêutica promissora no tratamento de vários tipos de doenças debilitantes, como é o caso de várias patologias genéticas ou doenças de foro oncológico<sup>[4]</sup>.

Ao serem introduzidos genes terapêuticos nas células do doente, a terapia génica tem a capacidade de abordar diretamente as causas fundamentais destas condições, oferecendo tratamentos potencialmente curativos<sup>[5]</sup>. Devido às suas propriedades únicas e possíveis benefícios, o *design*, produção e aplicação de DNA e mRNA sintéticos tem sido um tema importante na área da terapia génica<sup>[6]</sup>. Desta forma, a motivação por detrás do estudo do *design*, produção e aplicação de DNA e mRNA sintéticos na terapia génica, decorre do desejo de aprofundar o conhecimento sobre estas estratégias terapêuticas e fomentar um rápido desenvolvimento deste domínio.



## **2. Terapia Génica: Princípios e Aplicações**

### **2.1. DNA e RNA**

O DNA (ácido desoxirribonucleico) e o RNA (ácido ribonucleico) são dois tipos de ácidos nucleicos que desempenham papéis fundamentais para o funcionamento do organismo. O DNA tem como principal função, o armazenamento de informações genéticas. Por sua vez, o RNA, apresenta-se como essencial para a transmissão de informações genéticas e para a síntese de proteínas nas células, desempenhando uma variedade de funções vitais e estando envolvida em diversos processos biológicos <sup>[7]</sup>. Os nucleótidos são a unidade básica e fundamental da composição dos ácidos nucleicos. Estes são moléculas complexas, compostas por três componentes principais: a base azotada, que determina a informação genética; a pentose (que no caso do DNA é a desoxirribose e no caso do RNA é a ribose); e um grupo fosfato (o componente responsável por conferir a carga negativa à molécula e imprescindível na formação das ligações fosfodiéster que ligam os nucleótidos adjacentes) <sup>[8,9]</sup>.

Existem vários tipos de RNA, de entre os quais se destaca especialmente o mRNA (RNA mensageiro), pela sua capacidade de transporte de informação genética do DNA para os ribossomas, onde a síntese proteica ocorre. Os aminoácidos pertencentes às proteínas são determinados pelos codões de mRNA, que consistem em sequências de três bases azotadas <sup>[10]</sup>.

A compreensão das estruturas e funções dos ácidos nucleicos são fundamentais no desenvolvimento de terapias génicas eficazes, sendo que nos oferece conhecimento crítico na projeção de estratégias precisas na abordagem das causas fundamentais de várias patologias.

### **2.2. Definição e princípios da terapia génica**

Na terapia convencional, a falta, ou disfunção, de uma proteína só pode ser corrigida através do fornecimento externo dessa proteína no seu estado funcional ativo, ou de uma molécula que exerça uma função semelhante de forma direta ou indireta. A terapia génica surge como uma nova abordagem a esta problemática. Munida da capacidade de combater as causas genéticas subjacentes de determinadas doenças, esta estratégia terapêutica visa tratar, ou prevenir, patologias ao introduzir, ou modificar o material genético nas células do doente, proporcionando tratamentos de longo prazo ou, até mesmo, potencialmente curativos <sup>[11,12]</sup>.

A terapia génica é categorizada em dois grupos principais, conforme o tipo de células em que a inserção de genes acontece, terapia génica da linha germinativa e a terapia génica somática <sup>[13]</sup>.

Na terapia génica de linha germinativa, os genes adquiridos são passados a gerações futuras, passando a constituir parte integrante do genoma das células do organismo <sup>[5]</sup>. Esta abordagem não é amplamente aplicável devido aos riscos, a questões éticas associadas e à insuficiência de estudos sobre o impacto desta abordagem em gerações futuras <sup>[14]</sup>. Quanto à terapia génica somática, esta pode ser categorizada em duas estratégias principais: *in vivo* e *ex vivo* <sup>[15,16]</sup>.

Na terapia génica *in vivo*, os genes terapêuticos são administrados diretamente ao corpo do doente através de um dos vários métodos de entrega <sup>[12]</sup>, podendo envolver a transferência genética para um órgão específico, situação em que pode ser designada de *in situ* <sup>[17]</sup>. Por outro lado, a terapia génica *ex vivo* envolve o isolamento de células do doente, a sua modificação externamente ao organismo e, de seguida, a reintrodução das células modificadas no doente <sup>[5]</sup>. Na terapia génica somática, não ocorre transmissão dos genes às gerações futuras, restringindo-se apenas ao indivíduo tratado <sup>[13]</sup>.

No decorrer do presente documento será abordada a temática do *design*, produção e aplicação de DNA e mRNA sintéticos no âmbito da terapia génica.

### **2.3. Mecanismos de funcionamento da terapia génica**

Usualmente, a terapia génica envolve a transferência de material genético para as células do doente de forma a reverter uma condição anormal ou induzir uma nova propriedade. Dependendo do problema subjacente que provoque a doença, é possível aplicar várias abordagens, como a adição, a reparação ou a inativação de material genético. Os três principais métodos de funcionamento da terapia génica, compreendem: a adição de genes, onde se procede à adição de uma cópia saudável e funcional do gene a células que não o possuem ou têm uma cópia defeituosa deste. Um exemplo deste tipo de abordagem é a adição de um alelo normal do fator de coagulação IX humano no tratamento de hemofilia tipo B <sup>[18]</sup>; o silenciamento de genes (que envolve a entrega de material genético com o propósito de se ligar a um mRNA específico de forma a impedir a sua expressão) <sup>[19]</sup>; e a edição de genes (que envolve a entrega de material genético que pode ser usado para cortar, inserir ou alterar secções específicas de DNA de uma célula do indivíduo afetado) <sup>[20]</sup>.

### **2.4. Tipos de abordagem à terapia génica - O papel de DNA e mRNA**

Tendo presentes os mecanismos de funcionamento acima referidos, é importante destacar o papel de DNA e RNA em terapia génica. Começando pela terapia com DNA, esta abordagem envolve a entrega de DNA que codifica a produção de RNA que por sua vez

codifica uma proteína específica que irá tratar a doença. O DNA deve ser entregue ao núcleo da célula, onde permanecerá no caso de células quiescentes, fazendo com que este tipo de tratamento seja tipicamente de administração única <sup>[21,22]</sup>.

Ao contrário da terapia com DNA, na terapia com RNA é necessária a administração de doses repetidas para que se mantenha o efeito terapêutico, visto que o DNA da célula não é alterado <sup>[23]</sup>. O mRNA tem capacidade de se mover por diferentes partes de uma célula e carrega uma mensagem que fornece instruções para a produção de proteínas. Desta maneira, a terapia com mRNA é projetada de maneira a provocar a produção de uma proteína específica, quando o gene dessa proteína está ausente na célula, quando o gene é disfuncional ou quando é vantajoso induzir a produção dessa proteína no corpo humano. O mRNA é uma classe emergente de agentes terapêuticos para a prevenção e tratamento de uma ampla gama de doenças <sup>[11]</sup>. Podem ainda ser introduzidas pequenas sequências de RNA nas células, por exemplo os siRNAs ou microRNAs que permitem promover a degradação ou impedir a tradução de mRNAs complementares, desta forma silenciado o gene correspondente.

### **3. Introdução a DNA e mRNA sintéticos**

A biologia sintética surge como uma importante disciplina com o potencial para impactar várias aplicações acadêmicas e industriais, incluindo a criação de novas terapias, materiais e biossensores <sup>[24]</sup>. A capacidade de desenhar e sintetizar sequências de DNA e RNA tem implicações massivas na biotecnologia, particularmente nos campos de biologia sintética e no desenvolvimento de medicamentos e terapias baseados em ácidos nucleicos <sup>[25]</sup>. A síntese química de sequências de DNA e RNA recorre a diferentes métodos, tais como o método de fosfato de diéster, ou o método de fosfato triéster. No entanto, estes métodos têm vindo a ser substituídos por metodologias mais recentes e mais adequadas à síntese automatizada de DNA/RNA <sup>[25]</sup>.

A construção de DNA inicia-se com a síntese de oligonucleótidos, base por base, seguida pela montagem em fragmentos de DNA de cadeia dupla (dsDNA). Esses fragmentos podem então ser usados diretamente, clonados em vetores, ou montados em construções maiores <sup>[26]</sup>. Mais especificamente, a síntese de DNA sintético consiste na síntese de porções de DNA (com tamanhos compreendidos entre 250-2000 bp) a partir de oligonucleótidos sintéticos de cadeia simples <sup>[24]</sup>.

Avanços recentes tornaram possível a síntese de mRNA *in vitro* com a capacidade de ser traduzido de forma eficiente em proteínas por transcrição *in vitro* a partir de DNA (dispensando o recurso a células), sendo este relativamente estável quando introduzido em

células e dotado de capacidade reduzida de ativar uma resposta imunitária<sup>[27]</sup>. A utilização de mRNA apresenta algumas vantagens, quando comparado com terapias à base de DNA. Por um lado, o mRNA não precisa de ser integrado no núcleo da célula para mediar a tradução de proteínas. Por outro, o processo intracelular para a expressão de proteínas é muito mais simples e reduz-se o potencial risco de mutagenese por inserção no DNA. Estas características fazem com que o nível de expressão de proteínas seja de tal maneira aumentado, que se tornam comparáveis aos sistemas de expressão viral<sup>[11]</sup>. O mRNA sintético tem mostrado eficácia em diversas aplicações benéficas, como a imunização de doentes contra cancro<sup>[28]</sup> e doenças infecciosas<sup>[29]</sup> ou no alívio de sintomas de doenças, ao atuar na produção de proteínas deficientes<sup>[30]</sup>.

### **3.1. DNA sintético**

#### **3.1.1. DNA sintético – Síntese de Oligonucleótidos**

Devido à sua versatilidade e capacidade de interagir com sequências genéticas específicas, os oligonucleótidos desempenham um papel central em terapia génica. Oligonucleótidos são moléculas curtas, compostas por uma sequência de nucleótidos. Para que seja possível a produção de DNA sintético é necessária a produção de oligonucleótidos, através de um processo que permite a síntese controlada e personalizada de cadeias de nucleótidos.<sup>[24]</sup> Embora a síntese de oligonucleótidos tenha sido realizada anteriormente em solução, a abordagem em fase sólida para essas sínteses rapidamente tornou-se o método de preferência, mesmo para preparações em larga escala (5 a 15 mmol)<sup>[31]</sup>.

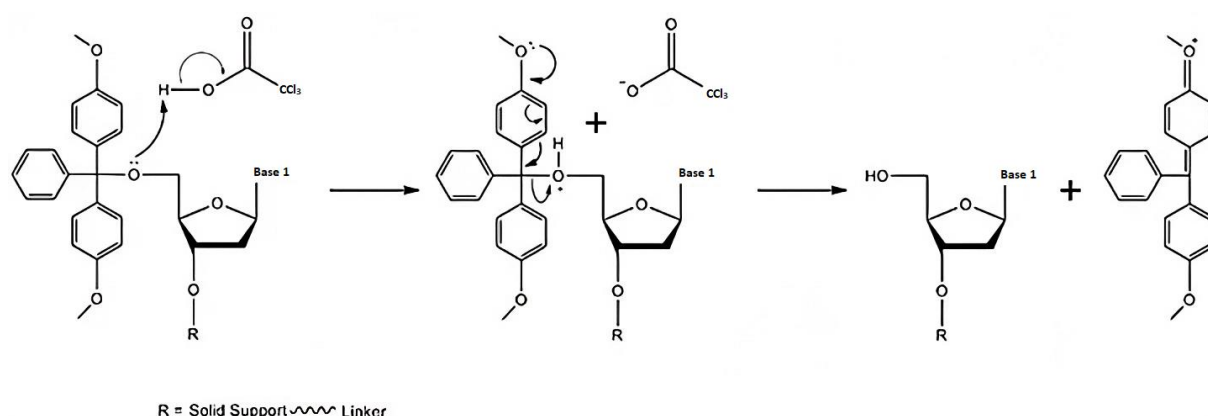
Com o decorrer do tempo, surgem melhorias subsequentes nos mecanismos de síntese de oligonucleótidos, até que se alcançou o desenvolvimento de métodos de produção de fosforamiditas, cuja robustez e fidelidade vêm possibilitar o desenvolvimento de procedimentos automatizados para a síntese de oligonucleótidos<sup>[24]</sup>. As fosforamiditas são isoladas como pós, estáveis à oxidação e hidrólise, em condições normais de laboratório. A capacidade de as converter de relativamente estáveis em intermediários altamente reativos, sob condições ácidas fracas, é a característica distintiva da abordagem dos fosforamiditas para a síntese de oligonucleótidos<sup>[25]</sup>. Estas substâncias permitem a adição sequencial de novas bases à cadeia de DNA através de uma reação cíclica de elevada eficiência e são hoje consideradas como a via *standard* na síntese moderna de DNA. Atualmente, seja em síntese com base em coluna, seja em síntese com base em microarranjos, a síntese de oligonucleótidos é conseguida através de variações de métodos de síntese que utilizam fosforamiditas<sup>[24]</sup>. Neste contexto, o desenvolvimento de suportes sólidos adequados, juntamente com métodos altamente

eficientes de reações de acoplamento, tem facilitado a síntese de oligonucleótidos usando sintetizadores automatizados de DNA <sup>[31]</sup>.

### 3.1.1.1. Síntese de oligonucleótidos com base em coluna

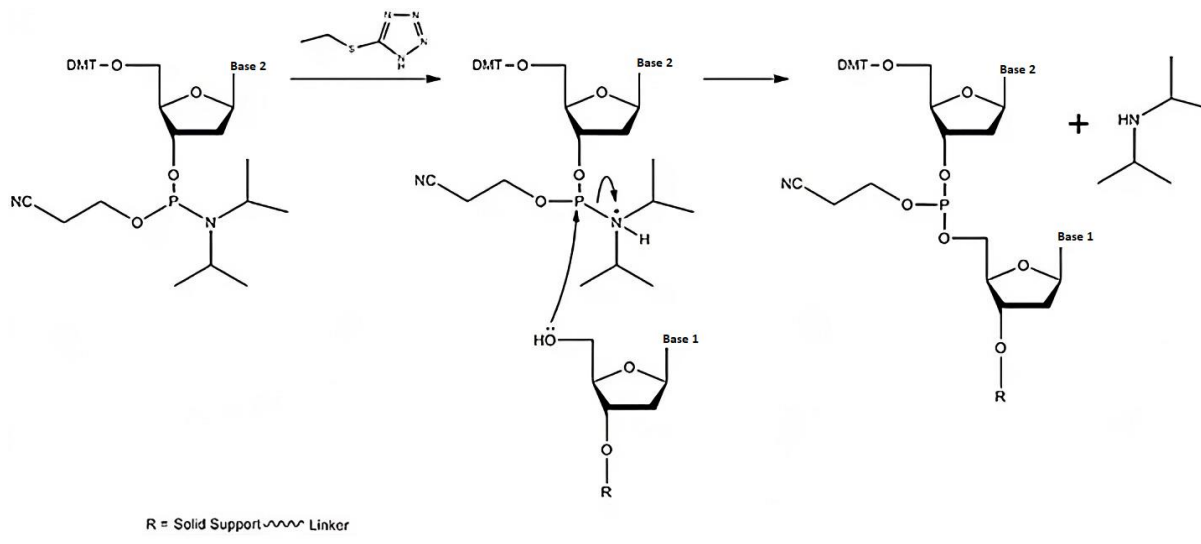
A síntese de oligonucleótidos com base em coluna é a tecnologia de primeira geração baseada na química de fosforamiditas, em que os reagentes são bombeados através das colunas, permitindo uma adição iterativa de nucleótidos <sup>[32]</sup>. Trata-se de um processo cíclico, composto por quatro etapas, que consiste na adição de uma nova base, por cada ciclo, a uma cadeia crescente de oligonucleótidos ligada a uma matriz de suporte sólida <sup>[33]</sup>.

A primeira etapa (detrilhação) inicia o processo com uma fosforamidita ligada a um suporte sólido (geralmente uma coluna de síntese). Esta fosforamidita encontra-se protegida por um grupo dimetoxitrietil (DMT), pelo que o primeiro passo consiste na desproteção deste através da adição de ácido tricloroacético e, assim, ativando-o para a elongação da cadeia com o próximo monómero de fosforamidita <sup>[24]</sup> (Figura 1).



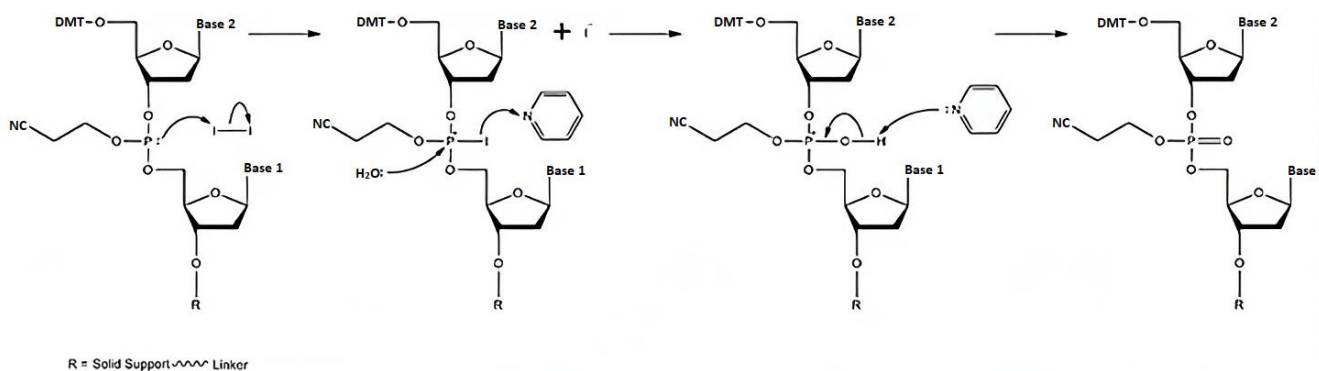
**Figura 1:** Processo de detrilhação <sup>[70]</sup>.

Na segunda etapa (acoplamento), a próxima base da sequência é adicionada sob a forma de uma fosforamidita protegida por DMT. Esta nova base é então acoplada ao grupo 5'-hidroxil da fosforamidita anterior, formando uma ligação fosfita triéster <sup>[24]</sup> (Figura 2).



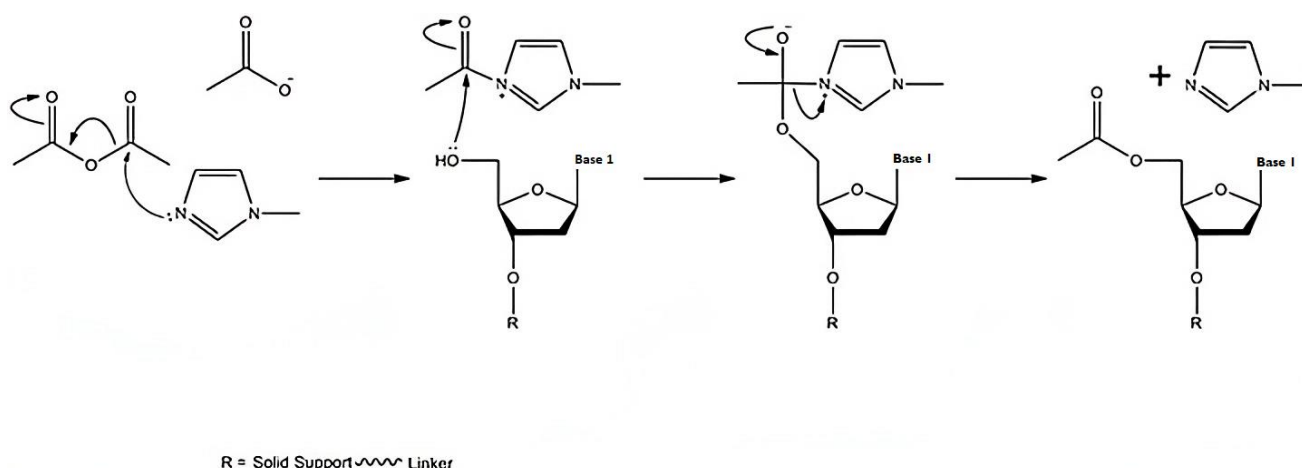
**Figura 2:** Processo de acoplamento [70].

Na terceira etapa (oxidação), quaisquer grupos 5'-hidroxil que não tenham reagido, são protegidos por acilação, tornando inertes as sequências que não foram estendidas, impedindo que estas possam vir a reagir nos próximos passos. Este passo é particularmente importante para reduzir a ocorrência de erros por deleção nas sequências de oligonucleótidos acabadas [24] (Figura 3).



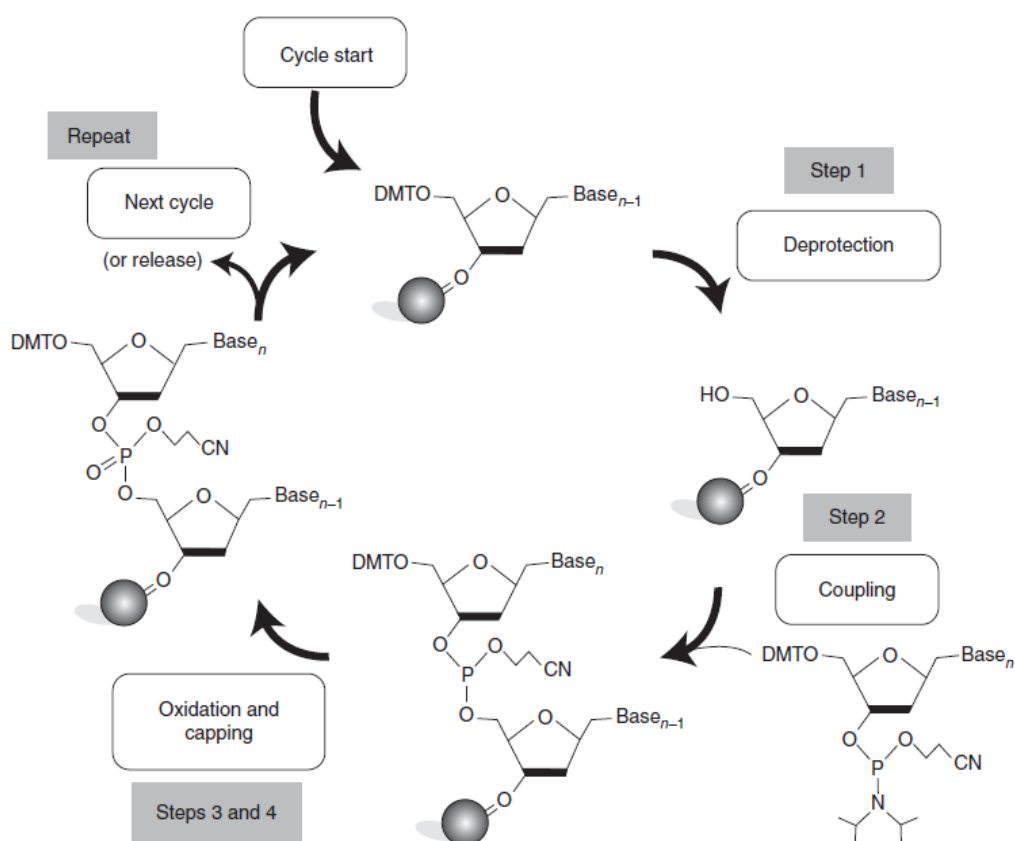
**Figura 3:** Processo de oxidação [70].

Finalmente, na quarta e última etapa (*capping*), a ligação fosfito triéster, criada na segunda etapa, é convertida a uma ligação fosfato através da oxidação com uma solução iodada, alongando o pilar principal da cadeia protegido por um grupo cianoetil [24] (Figura 4).



**Figura 4:** Processo de *capping* [70].

O ciclo repete-se, passando novamente por todas as etapas acima descritas, até que se obtenha a sequência de bases desejada. Neste momento, o oligonucleótido é clivado do suporte sólido e os grupos de proteção são removidos da estrutura principal [24] (Figura 5).



**Figura 5:** Síntese de oligonucleótidos através de métodos baseados em fosforamiditas [24].

As eficiências de acoplamento, na síntese baseada em coluna, são geralmente altas (tipicamente cerca de 99% por acoplamento), no entanto, quanto maior o comprimento do oligonucleótido, menor a eficiência de acoplamento, diminuindo o rendimento de oligonucleótidos completos <sup>[24]</sup>. Além disso, a depurinação, especialmente da adenosina, pode ocorrer durante a etapa de detritilação, dificultando a produção de oligonucleótidos longos. Adicionalmente, até os oligonucleótidos sintetizados com sucesso podem apresentar erros. Os erros mais predominantes em oligonucleótidos advêm de deleções de uma única base que resultam, ou da falha na remoção do grupo DMT, ou de ineficiências combinadas nas etapas de acoplamento e *capping* <sup>[33]</sup>.

Este processo automatizado geralmente sintetiza simultaneamente 96-384 oligonucleótidos em escalas de 10 a 100 nmol. Ao longo dos anos, melhorias na disponibilidade de matérias-primas, automação, processamento e purificação permitiram a síntese de até cerca de 100 nt (nucleótidos) a custos de aproximadamente \$ 0,05-0,15 por nucleótido, com taxas de erro de aproximadamente 1 em 200 nt <sup>[33]</sup>. No entanto, a síntese de oligonucleótidos baseada em colunas não consegue atender aos requisitos de síntese de DNA em larga escala na era da biologia sintética, devido às limitações de baixa taxa de produção e alto custo <sup>[33]</sup>.

### 3.1.1.2. Síntese de oligonucleótidos com base em microarranjo

Embora a síntese de oligonucleótidos seja uma prática cada vez mais difundida, os custos associados à produção destas biomoléculas permanecem elevados. Desta forma, as técnicas de síntese de oligonucleótidos com base em microarranjo (ou *microchips*) têm atraído considerável atenção, uma vez que são reconhecidas como fontes menos dispendiosas de oligonucleótidos <sup>[25]</sup>. Os sintetizadores baseados em microarranjo disponíveis comercialmente baseiam-se nos princípios químicos de fosforamiditas com pequenas alterações, sendo que as principais diferenças entre os vários métodos estão nos diferentes mecanismos aplicados nas etapas de desproteção e acoplamento de bases. De momento, existem métodos eletroquímicos, controlados por luz e por impressão de jato de tinta (*ink-jet printing*) <sup>[32]</sup>.

Os primeiros métodos controlados por luz, como o nome indica, utilizam luz no controlo da etapa de desproteção da síntese de oligonucleótidos e aplicam técnicas de fotolitografia para desproteger seletivamente fosforamiditas especiais com características fotolábeis <sup>[24]</sup>. A estratégia deste método consiste na iluminação da superfície de um suporte sólido, modificado com PPG (*photolabile 5' protecting groups*), com uma máscara (uma matriz usada para direcionar a exposição da luz) de forma a produzir grupos hidroxilo livres para o acoplamento do desoxinucleosídeo ativado da 3'-fosforamidita. Após o acoplamento e *capping*,



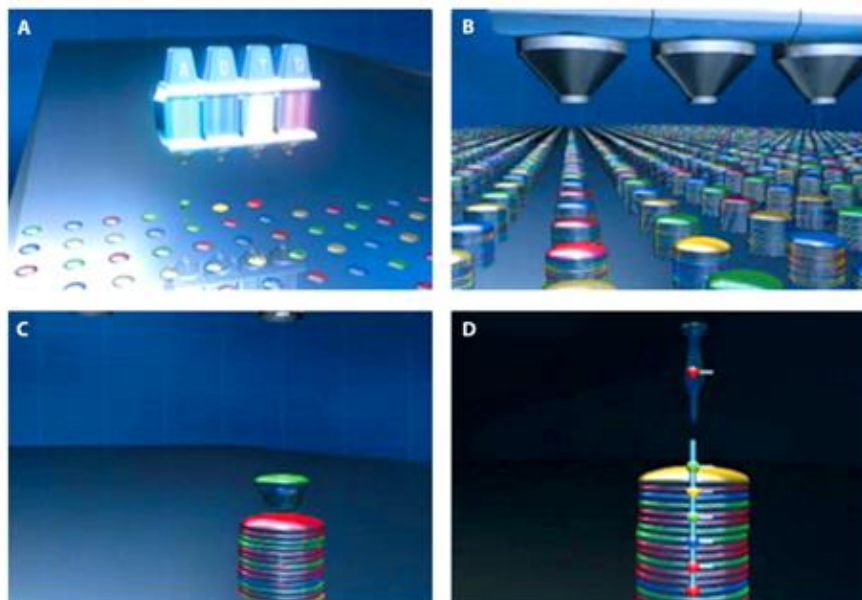
a superfície sólida é iluminada através de uma nova máscara, expondo o próximo grupo hidroxilo para um próximo acoplamento. O custo dispendioso das máscaras usadas e os tempos longos de síntese, limitam a aplicação deste método<sup>[32]</sup>.

Avanços tecnológicos acabaram por simplificar o processo proposto anteriormente, eliminando a necessidade da utilização das técnicas de fotolitografia e substituindo-as pelo uso de dispositivos programáveis de microespelhos, DMD (*Digital Micromirror Device*) de forma a controlarem com precisão as reações químicas sensíveis à luz<sup>[24]</sup>. O DMD forma uma imagem ultravioleta na superfície de um suporte de vidro, permitindo a desproteção seletiva sem a necessidade da utilização de máscaras de fotolitografia, consecutivamente diminuindo o custo associado e o tempo necessário de síntese. Alternativamente, também é possível recorrer a ácidos foto-gerados (ácidos gerados ou ativados por meio de exposição a luz) para ativar a reação de desproteção do grupo hidroxilo<sup>[32]</sup>.

Nos métodos eletroquímicos, são empregues microelétrodos para induzir reações eletroquímicas que resultam na produção de um ácido. Esse ácido irá desbloquear, de forma iterativa, os grupos 5'DMT das cadeias de oligonucleótidos em crescimento. O ácido é produzido apenas em locais específicos, e a sua difusão no local pretendido da matriz é controlada por um cátodo adjacente, que impede o desbloqueio de 5'DMT nos locais vizinhos ao consumir o ácido difundido. As fosforamiditas podem então ser adicionadas para a construção da sequência pretendida. Este processo teve sucesso somente na produção de cadeias pequenas de oligonucleótidos. Uma limitação fundamental deste método compreende a quantidade de ácido produzido, visto que um excesso ou uma insuficiência do desbloqueio mediado por ácido afeta dramaticamente a qualidade e integridade da sequência criada<sup>[25]</sup>.

Alternativamente às técnicas acima descritas, foram ainda desenvolvidas tecnologias baseadas em impressão de jato de tinta (*ink-jet printing*), que vêm permitir a utilização de fosforamiditas e reagentes normais, não sendo necessária a utilização de fosforamiditas com características fotolábeis. O princípio da síntese de oligonucleótidos por impressão de jato de tinta baseia-se na utilização de uma “cabeça de impressão” piezoelétrica para depositar pequenas gotas de reagente numa superfície sólida. Estas gotas contêm os componentes necessários para a construção de oligonucleótidos, como fosforamiditas e nucleótidos. À medida que as gotas de reagentes secam, formam uma superfície sólida. Nesta superfície, as fosforamiditas e nucleótidos reagem entre si, formando a sequência de oligonucleótidos desejada<sup>[24]</sup>. Este é um método particularmente versátil, que permite uma construção rápida de oligonucleótidos contendo as sequências desejadas e tem sido maioritariamente

desenvolvido e utilizado para aplicações de perfis de expressão génica e para hibridização genómica comparativa <sup>[25]</sup> (Figura 6).



**Figura 6:** Síntese de oligonucleótidos por impressão de jato de tinta. (A) O dispositivo proporciona um pequeno e preciso volume de nucleótidos para a primeira camada na superfície do microarranjo. (B) Rondas repetidas de impressão estendem o comprimento dos oligonucleótidos. (C) Oligonucleótidos em crescimento. (D) O resultado apresenta-se com a sequência de oligonucleótidos desejada <sup>[69]</sup>.

As tecnologias baseadas em microarranjo são as que, atualmente, oferecem melhor relação entre o custo, o tamanho do oligonucleótido sintetizado e a precisão deste. A escala de produção destes métodos é menor comparativamente a quando se utilizam técnicas baseadas em coluna, portanto, como consequência é precisa uma quantidade menor de reagentes para que se consiga a síntese, levando a uma diminuição dos custos associados. Além da redução da escala de síntese, os sintetizadores de oligonucleótidos baseados em *chips* oferecem níveis de *multiplexing* (capacidade de sintetizar simultaneamente várias sequências de oligonucleótidos) que não são possíveis nos sintetizadores tradicionais baseados em coluna, tornando esta tecnologia ainda mais eficiente e económica. Sendo que estas técnicas têm a capacidade de suportar milhares de sequências por superfície sólida e existindo sintetizadores capazes de produzir múltiplas superfícies em simultâneo, a capacidade dos métodos de síntese baseados em microarranjo superam até os maiores instrumentos baseados em colunas <sup>[24]</sup>.

A escala de síntese reduzida e uma capacidade de *multiplexing* resulta num custo de síntese de oligonucleótidos que varia entre \$ 0,00001 a \$ 0,0001 por nucleótido (dependendo do comprimento do oligonucleótido e da escala da síntese) <sup>[32]</sup>. Quando comparado com o custo de \$ 0,05 a \$ 0,10 por base, em técnicas de síntese de oligonucleótidos baseadas em coluna, a atratividade desta tecnologia, para aplicações de síntese de genes, torna-se óbvia. No entanto existem algumas dificuldades a ultrapassar com estes métodos, principalmente relacionados com o facto de os oligonucleótidos sintetizados em microarranjos tenderem a ter uma qualidade relativamente baixa, o que leva a mais erros relacionados com a síntese quando comparados com os oligonucleótidos sintetizados em coluna <sup>[24]</sup>.

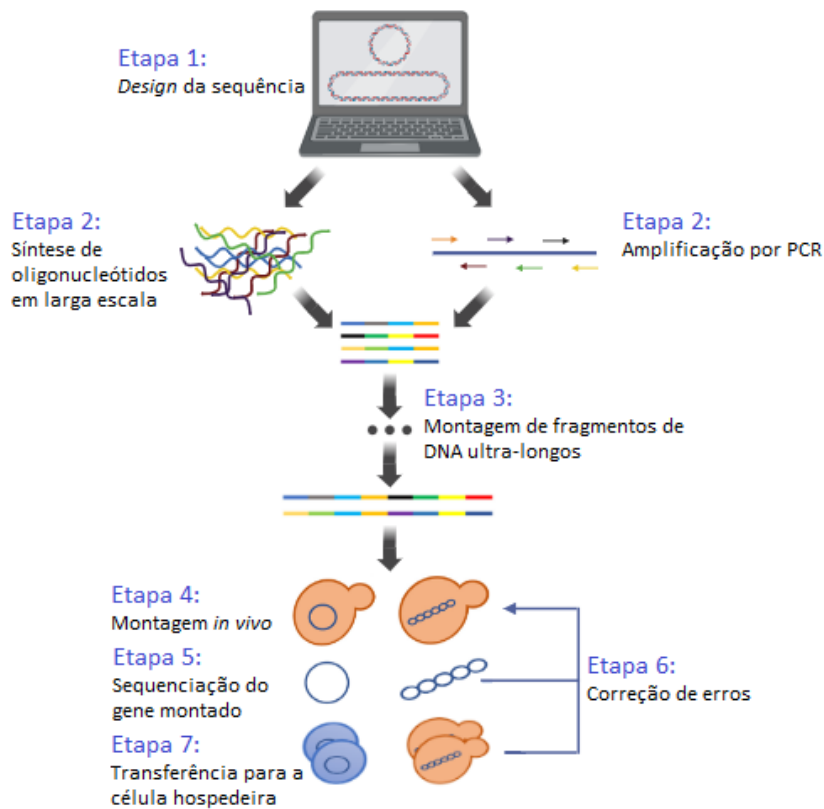
Alternativamente aos métodos com base na química das fosforamiditas, foram desenvolvidos novos métodos para a síntese de oligonucleótidos, desta vez na forma de métodos enzimáticos. Os métodos enzimáticos apresentam-se na forma de duas modalidades principais, os métodos baseados em polimerase independentes de molde e métodos baseados em polimerase dependentes de molde <sup>[32]</sup>. Os métodos independentes de molde utilizam uma polimerase específica de DNA, designada de transferase terminal de desoxirribonucleotideo (TdT) (*terminal desoxinucleotidil transferase (TdT)*), que irá atuar como reagente, bem como catalisador na adição progressiva do nucleotídeo à extremidade 3' OH do oligonucleótido <sup>[34]</sup>. Quanto aos métodos dependentes de molde, estes utilizam um molde de DNA imobilizado numa superfície sólida e de seguida é projetado um oligonucleótido de forma a que este possua uma sequência que lhe permita estabelecer uma ligação ao DNA molde. De seguida, é adicionada uma polimerase que irá catalizar a adição de nucleótidos à cadeia. O processo é repetido até que o oligonucleótido desejado seja sintetizado <sup>[32]</sup>.

Estas metodologias são ainda muito recentes e uma vez que a síntese enzimática de oligonucleótidos ainda não se tornou uma prática significativamente difundida, ainda existem muitas incógnitas sobre o potencial destes métodos <sup>[35]</sup>. No entanto, os resultados preliminares, atualmente disponíveis, demonstram que, embora o rendimento da reação e o comprimento máximo da cadeia sintetizada ainda seja inferior aos métodos com base em fosforamiditas, o tempo de acoplamento dos métodos enzimáticos mostrou-se significativamente mais curto. Apresenta-se, portanto, como um novo método promissor, em que o conhecimento adquirido durante a otimização dos métodos químicos pode ser útil para acelerar o processo de desenvolvimento da síntese enzimática <sup>[32]</sup>.

### 3.1.2. Síntese do Gene

Os primeiros métodos de ligação de oligonucleótidos com vista à produção de sequências de DNA mais ou menos longas dependiam da utilização de DNA ligase e a ligação de oligonucleótidos adjacentes era feita sequencialmente, mas à medida que os métodos de montagem e a qualidade dos próprios oligonucleótidos sintéticos foram melhorando, foi adotado o uso de ligases termoestáveis e tornou-se possível a montagem de *synthons* num passo único. Depois da descoberta da reação em cadeia da polimerase (PCR), foram desenvolvidos métodos que não dependem de ligases para a montagem do DNA e, desde então, inúmeros outros métodos foram desenvolvidos <sup>[24]</sup>.

Atualmente, o fluxo de trabalho para a construção do gene sintético, pode ser resumido em sete etapas principais. Na primeira, a sequência do gene a ser sintetizado é projetada num computador, recorrendo a várias ferramentas de *design* genómico <sup>[36]</sup>. Na segunda etapa, recorre-se a uma de duas estratégias. Pode-se recorrer à síntese de oligonucleótidos em larga escala, de forma a gerar grandes quantidades de pequenos fragmentos de DNA para que estes sejam montados numa molécula de DNA maior. Ou, alternativamente, utiliza-se a amplificação por PCR para gerar o gene-alvo, utilizando *primers* produzidos por métodos tradicionais baseados em coluna. No terceiro passo, os fragmentos de DNA produzidos na segunda etapa, passam por várias rondas de montagem de DNA, de forma a serem gerados fragmentos de DNA ultra-longos. No quarto passo, os fragmentos ultra-longos são montados para se obter o tamanho final do gene. Devido à baixa eficiência da montagem *in vitro*, a montagem *in vivo* é, geralmente, a escolha preferencial. A etapa cinco consiste na sequenciação do gene montado para verificar a ocorrência de erros. Caso se detetem erros, a etapa seis consiste numa etapa de correção de erros. Por fim, na última etapa, o gene sintetizado é transferido para uma célula hospedeira apropriada <sup>[32]</sup> (Figura 7).



**Figura 7:** Fluxo de trabalho da construção do gene sintético [32].

É importante ressaltar que a correção de erros é uma etapa crucial para a síntese do gene. A maioria dos métodos para remover erros das sequências de DNA sintético recorrem à formação de um heteroduplex de DNA. Este heteroduplex consiste numa molécula de DNA de cadeia dupla, composta por duas cadeias de DNA que provêm de fontes diferentes ou têm sequências distintas. Em termos simplistas, um DNA heteroduplex é uma molécula de DNA híbrida, formada pelo emparelhamento de cadeias de DNA que não são totalmente idênticas. O processo de correção baseia-se na capacidade de enzimas de reparação, como as endonucleases, de reconhecerem a diferença entre as bases corretas e as bases incorretas do heteroduplex. Estas enzimas têm a capacidade de cortar a região que contém o erro e isso estimula a célula a substituir a sequência errada pela sequência correta durante o processo de reparação [24].

Inovações recentes têm procurado reduzir o custo da síntese de oligonucleótidos de DNA e a sua subsequente montagem e as ferramentas de edição de bases CRISPR/Cas9 que se encontram, atualmente, em rápido desenvolvimento, têm potencial para no futuro serem utilizadas no processo de correção de erros [37,32].

### 3.2. mRNA sintético

O RNA mensageiro (mRNA) é um tipo de ácido ribonucleico de cadeia simples que é transcrito a partir de uma cadeia de DNA, transportando a informação codificadora para a síntese de proteínas até aos ribossomas, para ser posteriormente transcrito e processado em proteínas funcionais<sup>[4]</sup>. Desta forma, várias aplicações clínicas podem ser alcançadas através da utilização de sequências de mRNA como agentes terapêuticos em terapia gênica. O mRNA pode ser usado para substituir proteínas, utilizando terapias de substituição<sup>[39,42]</sup>; limitar os níveis de proteínas, através de abordagens que utilizam microRNAs ou Cas9<sup>[4,42]</sup>; ou para reparar mutações de proteínas ao nível do DNA, através de edição genética<sup>[11,42]</sup>. Atualmente, existe um grande interesse nas próximas aplicações terapêuticas com mRNA, não apenas em medicamentos aplicáveis *in vivo*, mas também em várias vertentes *ex vivo* ou *in vitro*, algumas das quais já são utilizadas em ambientes pré-clínicos e clínicos<sup>[40]</sup>.

No decorrer dos últimos anos, as terapias e vacinas de mRNA passaram por uma rápida transição, passando de curiosidade para uma realidade com impacto significativo no mundo<sup>[40]</sup>. Em 2020, a pandemia da COVID-19 catalisou o mais rápido desenvolvimento de vacinas da história, com as vacinas de mRNA na vanguarda desses esforços<sup>[29]</sup>. Estas vacinas foram inovadoras por três principais razões. Em primeiro lugar, foram desenvolvidas em meses, em vez dos anos que são tipicamente necessários para o desenvolvimento de qualquer medicação. Em segundo lugar, as vacinas foram tremendamente eficazes, reduzindo a carga viral em doentes infetados previamente vacinados, reduzindo a infeção em até 95% nos ensaios clínicos e reduzindo substancialmente a incidência e gravidade da infeção no mundo real. Por último, existem evidências que sugerem que as vacinas de mRNA protegem contra variantes emergentes do SARS-CoV-2, incluindo aquelas com mutações nas proteínas *spike*. Dado que a LNP (a partícula nanolipídica que foi utilizada como vetor) permanece a mesma, estima-se que vacinas baseadas em mRNA codificando uma nova variante poderiam ser produzidas em apenas seis semanas. Esta capacidade de responder a uma variante emergente do SARS-CoV-2 sem a necessidade de reengenharia massiva da formulação LNP-mRNA, procedimentos de fabricação ou distribuição é crítica, principalmente à medida que aumenta a frequência com que vírus zoonóticos infetam o ser humano<sup>[42]</sup>.

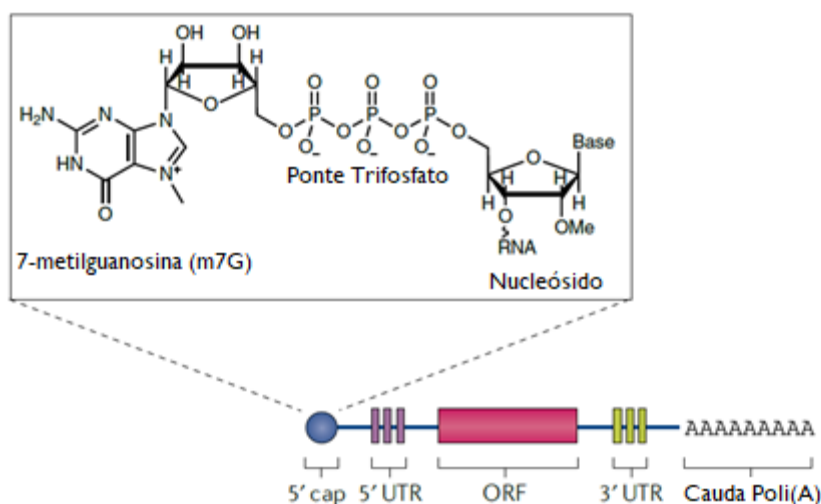
Outra vertente de utilidade de mRNA é na terapia contra doenças oncológicas. As vacinas de mRNA são uma plataforma imunoterapêutica atrativa e poderosa contra o cancro devido à sua elevada potência, especificidade, versatilidade, capacidade de desenvolvimento rápido e em grande escala, potencial de fabrico de baixo custo e segurança<sup>[28]</sup>.

As terapias baseadas em RNA mensageiro deram passos significativos, alcançando melhorias notáveis na estabilidade, função e produção do mRNA ao longo dos últimos anos. A estratégia destas terapias passa pela exploração das células do hospedeiro, utilizando-as como fábricas de produção de antígenos ou proteínas funcionais, com eficácia promissora e segurança suficiente<sup>[4]</sup>.

### 3.2.1. Design e Síntese de mRNA

Um dos benefícios das terapias com base em mRNA é que estas moléculas podem ser sintetizadas na ausência de células. Isso elimina a necessidade de validar impurezas derivadas de uma síntese celular. Adicionalmente, sendo que o mRNA pode ser sintetizado *in vitro*, a capacidade de produção torna-se mais flexível, podendo ser facilmente ajustada para sintetizar vários mRNAs que codificam proteínas de interesse, através de pequenas alterações no processo de síntese<sup>[43]</sup>.

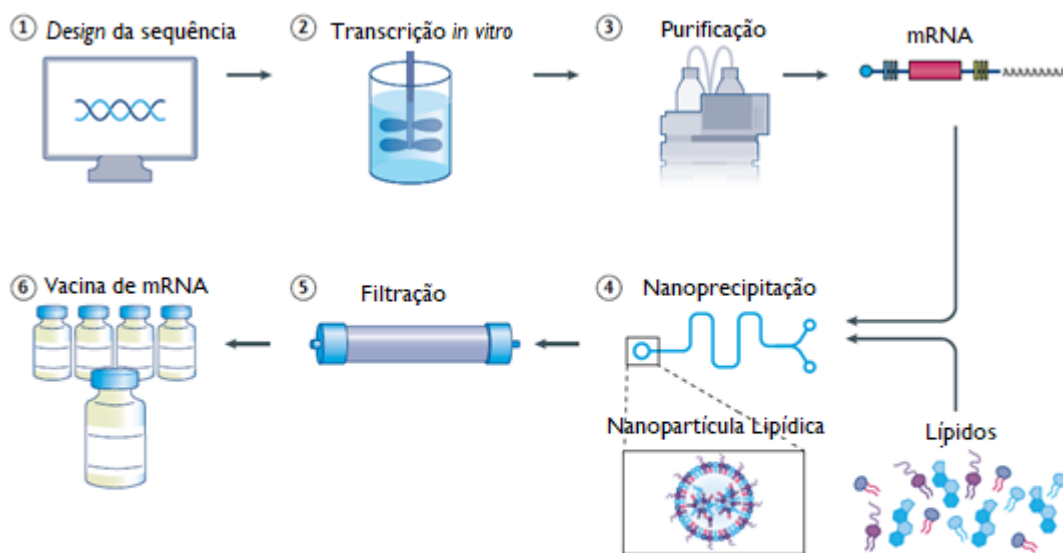
Estruturalmente, os mRNAs produzidos por transcrição *in vitro* (IVT) são semelhantes aos mRNAs que ocorrem naturalmente. Estes consistem em cinco domínios principais: um *cap* 5', uma região de leitura não traduzida 5' (UTR - *Untranslated Region*), uma região de leitura aberta (ORF - *Open Reading Frame*), uma UTR 3' e uma cauda poliadenilada (poliA) 3'<sup>[38]</sup> (Figura 8).



**Figura 8:** Estrutura de mRNA<sup>[29]</sup>.

A *cap* 5' proporciona proteção contra nucleases, ao mesmo tempo que promove a iniciação da tradução ligando-se ao fator de iniciação da tradução eucariótica 4E (eIF4E)<sup>[38]</sup>. As regiões de leitura não traduzidas (UTRs) localizam-se em ambos os lados de uma região de leitura aberta (ORF). As UTRs controlam a eficiência da tradução, a estabilidade e a localização subcelular dos mRNAs. A ORF fornece informação genética para o processo de tradução, começando com um codão de iniciação (AUG) e terminando com um codão de terminação (UAA, UAG, UGA). A cauda poli(A) 3' está envolvida no passo de iniciação da tradução quando se liga à proteína PABP (*poly-A-binding protein*), sendo que, o comprimento desta cauda, afeta significativamente a estabilidade e a eficiência da tradução dos mRNAs<sup>[11]</sup>.

Atualmente, o processo de produção de mRNA pode ser dividido em duas etapas principais: montante e jusante. A etapa a montante, evolui a produção do mRNA por IVT. A etapa jusante envolve a purificação, concentração e filtração estéril, de forma a obter um produto altamente homogêneo<sup>[43]</sup>. Após a transcrição *in vitro*, a solução final contém os produtos de transcrição (mRNAs), bem como reagentes remanescentes<sup>[11]</sup>. Desta forma, um dos passos cruciais para a síntese de mRNA consiste na etapa de purificação, onde são removidos quaisquer contaminantes (Figura 9). Estes contaminantes incluem nucleósidos que não reagiram, enzimas, RNA de cadeia dupla e o molde de DNA linear utilizado para a transcrição<sup>[11,43]</sup>. O método mais amplamente utilizado na purificação de mRNA em larga escala consiste na utilização de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).



**Figura 9:** Etapas da produção de IVT mRNA<sup>[29]</sup>.



### 3.2.1.1. *Design* de IVT mRNA

No momento do *design*, existem vários fatores que terão impacto no sucesso do mRNA produzido por IVT. A tradução e estabilidade dos mRNAs podem ser melhoradas através da otimização das UTRs [45]. Geralmente, sequências UTR de genes altamente expressos apresentam altos níveis de tradução e estabilidade e, portanto, são amplamente utilizadas para a síntese de mRNA. Da mesma maneira, uma melhor expressão dos mRNAs pode ser alcançada a partir do desenvolvimento e triagem de novas sequências UTR e a partir da combinação de UTRs 5' e 3' de forma a otimizar a eficiência de tradução [46,47]. Além disso, caudas de poli(A) com comprimentos de 100 a 150 nucleótidos podem melhorar a estabilidade dos mRNAs e iniciar eficientemente a tradução formando complexos com proteínas de ligação de poli(A) [38]. Relativamente à ORF, esta é especialmente importante, pois constitui grande parte da molécula de mRNA. Desta forma, a modulação dessa região, especificamente no contexto da otimização de codões, afeta a estabilidade geral do mRNA e a sua capacidade de tradução. A taxa de tradução é controlada principalmente pelas moléculas de tRNA, assim sendo, a otimização dos codões presentes no IVT-mRNA no sentido de diminuir o uso de espécies raras de tRNA e substituí-las por codões utilizados por espécies de tRNA mais comuns, não só afeta a produção proteica como a fidelidade da tradução [43]. Relativamente à imunoestimulação, uma das estratégias mais eficazes para combater este efeito é através da incorporação de nucleótidos modificados e pela purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa [44]. Quando comparados com mRNAs não modificados, a incorporação de nucleótidos modificados evita o reconhecimento destas moléculas pelos recetores *Toll-like* (TLRs) assim reduzindo a produção de citocinas [38]. Além da incorporação de nucleótidos modificados, os IVT mRNAs purificados por HPLC apresentam uma expressão proteica significativamente maior e menor indução de respostas imunitárias, quando comparados com mRNAs não purificados [48]. Embora a purificação por HPLC seja amplamente utilizada na produção de IVT mRNA, é possível recorrer a um método de purificação baseado em celulose que é mais simples, rápido e menos dispendioso [38,44]. O *design* do *cap* 5' oferece outro método para reduzir respostas imunitárias indesejadas causadas por mRNAs. O *cap* 5' eucariótico natural (*cap*-0) consiste numa 7-metilguanósina (m7G) ligada ao primeiro nucleótido localizado na extremidade 5' do mRNA através de uma ponte trifosfato 5'-5' (m7GpppN). A adição de grupos metilo ao primeiro e segundo nucleótidos transcritos produz as estruturas de *Cap*-1 e de *Cap*-2. Estas *caps* são mais amplamente utilizadas na síntese de mRNA devido ao seu menor potencial imunoestimulatório. Atualmente, os mRNAs com estrutura de *cap*-1 podem ser convenientemente produzidos através de um método de

captação co-transcricional exibindo um mínimo de imunoestimulação e satisfazendo a eficiência de tradução [38,43].

### 3.2.1.2. Síntese de mRNA por transcrição *in vitro*

O mRNA sintético pode ser preparado por transcrição *in vitro* (IVT) de um modelo de DNA usando a polimerase de RNA de bacteriófagos (T7, SP6, T3). Os mRNA IVT sintetizados consistem em moléculas de RNA de cadeia simples que medeiam a expressão da proteína-alvo de maneira semelhante ao mRNA eucariótico natural. A solução da reação IVT é constituída por quatro tipos de trifosfatos de ribonucleosídeos (rNTPs), RNA polimerase e o molde de DNA. Os rNTPs incluem o GTP, ATP, CTP e UTP. O molde de DNA para transcrição *in vitro* requer pelo menos quatro elementos: o promotor de bacteriófago, região não traduzida (UTR), a região de leitura aberta (ORF) e sequência de poli(T) [11].

A síntese de mRNA IVT é realizada pela adição de polimerases (T7, T3 ou SP6), mas requer *capping* adicional. Além do mRNA sem *cap* ser rapidamente degradado por RNases, este contém um grupo 5'-ppp, o que causa uma maior estimulação imunitária. Podem ser implementados dois métodos para o *capping* de IVT mRNA: *capping* co-transcricional e *capping* pós-transcricional. Misturas de dinucleótidos de *cap* contendo os quatro trifosfatos de ribonucleosídeos (rNTPs) acima mencionados, são incorporadas na extremidade 5' do RNA com a RNA polimerase durante o *capping* co-transcricional. O processamento de *capping* co-transcricional permite a transcrição coordenada com o *capping* de mRNA, no entanto, neste processo ocorre a incorporação competitiva de nucleósidos GTP, o que prejudica a eficiência do *capping* [41]. No *capping* pós-transcricional, a molécula de mRNA é primeiro transcrita sem a estrutura de *cap*. Após a transcrição estar completa, o mRNA passa por etapas adicionais de processamento para adicionar a estrutura de *cap* na sua extremidade 5' através de reações enzimáticas. No entanto, a quantidade de enzima necessária para este processo impede a sua aplicabilidade, sendo que se apresenta como uma alternativa com pior relação de qualidade e preço [49].

Conforme exposto anteriormente, é necessário considerar a estimulação imunitária do IVT mRNA. Para tal é usada uma metiltransferase específica de *capping* 2'-O, para produzir *cap*-1 ou *cap*-2 com base no *cap*-0, reduzindo a imunogenicidade do IVT mRNA. Quanto às caudas poli(A) dos IVT mRNA, estas são normalmente codificadas no molde de DNA ou anexadas ao IVT mRNA por poliadenilação enzimática, sendo que a primeira opção oferece um controlo mais preciso sobre o comprimento da cauda poli(A) [41].

Após a transcrição *in vitro*, o molde de DNA é digerido por tratamento com DNase e a remoção do grupo trifosfato 5' dos mRNAs é realizada usando uma fosfatase específica. A remoção do trifosfato reduz a possível resposta imunitária. De seguida recorre-se ao passo de purificação de forma a remover todos os contaminantes e, assim, reduzir a possibilidade da ocorrência de uma resposta imunitária<sup>[1]</sup>.

Na Tabela I, apresenta-se um resumo de alguns itens de controlo de qualidade na preparação de medicamentos à base de mRNA e o impacto que estes apresentam no produto final.

**Tabela 1:** Controlo de qualidade na preparação de medicamentos à base de mRNA [4].

<b>Controlo de qualidade na preparação de medicamentos à base de mRNA</b>		
<b>Composição</b>	<b>Itens de controlo de qualidade</b>	<b>Resultado</b>
<b>mRNA codificado por antigénio</b>	Otimização de codão	Eficiência de tradução
	Quantidade de ácidos nucleicos	Eficiência de tradução
	pH durante a síntese de mRNA	Eficiência de tradução
	Sequência de mRNA	Eficiência de tradução
	Integridade da sequência de mRNA	Eficiência de tradução
	Comprimento da cauda poly(A)	Eficiência de tradução
	Eficiência do processo de <i>capping</i> 5'	Eficiência de tradução
	Otimização da 5'-UTR e 3'-UTR	Eficiência de tradução
	Pureza de mRNA	Eficiência de tradução
	Molde de DNA residual	Eficiência de tradução
<b>Sistema de entrega lipídica</b>	Análise de espectrometria de massa	Eficiência de tradução
	Análise de Ressonância Magnética Nuclear	Eficiência de tradução
	Componentes lipídicos	Eficiência de tradução
	Carga elétrica dos componentes lipídicos	Direcionamento
	Tipo e teor de lipídios	Direcionamento
	Ponto Isoelétrico	Estabilidade
	Micromorfologia	Uniformidade
	Impurezas lipídicas	Eficiência de tradução
	Distribuição	Direcionamento
	Eficiência de Transfecção <i>in vivo</i>	Eficiência de tradução
	Eficiência de Transfecção <i>in vitro</i>	Eficiência de tradução
<b>mRNA-LNP</b>	Eficiência de encapsulamento	Capacidade de carga
	Tamanho de partícula	Uniformidade
	Potencial zeta	Estabilidade
	Condições de armazenamento	Aplicação Clínica
	Princípio de libertação	Potencial Terapêutico

#### 4. Métodos de transferência de mRNA

Um dos fatores cruciais para o sucesso da terapia gênica consiste na entrega eficiente do gene ao tecido/células-alvo. Para o efeito, recorrem-se a métodos de transferência genética. Existem, métodos físicos<sup>[50]</sup>, métodos químicos<sup>[51]</sup> e vetores virais<sup>[52]</sup>. A escolha do método deve ser feita tendo em conta vários parâmetros. Estes parâmetros incluem: limitações de tamanho para a inserção de transgenes, a pureza do vetor, eficiência de transfecção, a capacidade que o vetor tem de infectar células em divisão e/ou em repouso, a capacidade de expressão a longo prazo, a integração no genoma hospedeiro, a necessidade de especificidade de tipo celular ou entrega direcionada, e a toxicidade e imunogenicidade associadas ao método de transferência<sup>[53]</sup>. Os vetores virais apresentam-se como altamente eficazes na entrega de ácidos nucleicos, no entanto existem várias preocupações relativamente à segurança da sua utilização<sup>[52]</sup>. Os vetores não virais são preferidos nalgumas aplicações de terapia gênica, pois possuem atributos que permitem a sua personalização, apesar de apresentarem eficiências de transfecção mais baixas<sup>[50,51]</sup>.

Apesar do desenvolvimento de numerosos sistemas de entrega virais e não-virais nas últimas décadas, todos eles apresentam algumas desvantagens que limitam a sua aplicação clínica. Desta forma, ainda nenhum sistema de entrega foi concebido com a capacidade de ser aplicado em terapia gênica de todos os tipos de células, tanto *in vitro* como *in vivo* e sem limitações ou efeitos secundários<sup>[54]</sup>. Na verdade, tem vindo a tornar-se claro que o sistema de entrega tem de ser adaptado a cada situação específica.

Atualmente, os principais sistemas de entrega de mRNA são nanopartículas à base de lípidos, nanopartículas à base de polímeros e nanopartículas híbridas lípido-polímero<sup>[38]</sup>.

##### 4.1. Nanopartículas à base de lípidos (LNPs)

Estas nanopartículas compostas por lípidos são projetadas para serem biocompatíveis e terem capacidade de serem internalizadas nas células através de endocitose<sup>[28]</sup>. Uma vez dentro das células-alvo, as LNP libertam a sua carga terapêutica, permitindo a tradução do material genético em proteínas funcionais ou influenciando a expressão genética<sup>[51]</sup>. Para além de terem sido utilizadas no desenvolvimento das vacinas de mRNA contra a COVID-19<sup>[28]</sup>, foram também utilizadas como vetor no primeiro tratamento de siRNAs aprovado pela FDA e EMA, na forma de Patisiran<sup>®</sup> ou Onpattro<sup>®</sup><sup>[55]</sup>.

Onpattro<sup>®</sup> é um medicamento utilizado para tratar danos nos nervos periféricos causados devidos a amiloidose hereditária por mutação no gene que codifica a proteína transtirretina, uma doença caracterizada por uma acumulação de agregados amiloides de

transtirretina em diversos tecidos do organismo <sup>[56]</sup>. Em doentes com esta condição, é produzida uma transtirretina defeituosa (uma proteína de transporte de tiroxina e retinol) quebra com facilidade, o que conduz à sua agregação e acumulação em diferentes tecidos e órgãos, incluindo os nervos periféricos, interferindo com as funções normais destes <sup>[57]</sup>. O siRNA presente nesta medicação é desenhado de forma a ligar-se ao mRNA que codifica para a transtirretina promovendo a sua degradação por um mecanismo de interferência de RNA, reduzindo a produção da proteína defeituosa e diminuindo a formação agregados amilóides, bloqueando a progressão da doença, mas não revertendo potenciais lesões que se tenham desenvolvido antes da administração do medicamento. <sup>[58]</sup>

Quanto às vacinas de mRNA contra o SARS-CoV-2, estas surgem na forma de injeções intramusculares de nanopartículas lipídicas (LNPs). O mRNA presente na vacina codifica a proteína *spike* do vírus. Esta proteína é tipicamente utilizada pelo vírus para que este se ligue a células humanas. Quando o mRNA é introduzido no organismo, as células usam-no para produzir a proteína *spike* e o sistema imunitário irá identificá-la como um agente invasor, produzindo anticorpos para combatê-la. Se o indivíduo for exposto ao vírus real, os anticorpos já estarão presentes no organismo e ajudarão a combater o vírus real e a prevenir a doença <sup>[4]</sup>.

## 4.2. Nanopartículas à base de polímeros

Os polímeros catiónicos têm sido um tipo essencial de vetor não viral, devido à sua estrutura química versátil e um alto potencial de carga. Estes compostos têm a capacidade de formar um complexo com o material genético (poliplexo), neutralizando a carga negativa destes. A formação do poliplexo é importante na proteção do material genético contra degradação e no transporte deste até ao alvo <sup>[59]</sup>. Dentro deste grupo, existem polímeros biodegradáveis e polímeros não biodegradáveis. Dentro dos não biodegradáveis, destaca-se a polietilenimina (PEI), este foi o primeiro polímero sintetizado em formas lineares e ramificadas para aplicação em terapia génica <sup>[51]</sup>. Quando o PEI é usado como vetor, este induz um efeito osmótico denominado “efeito de esponja de protões”, devido à sua carga positiva. Este fenómeno leva ao aumento de pressão osmótica dentro dos endossomas, que leva ao eventual expansão e rutura do endossoma, libertando o seu conteúdo para o citoplasma da célula, incluindo o material genético transportado pelo PEI <sup>[60]</sup>. Este acontecimento considera-se positivo, sendo que permite que o material genético seja libertado dos endossomas e disseminado pelo citoplasma da célula, conferindo uma maior eficiência de transfecção por parte deste vetor. No entanto, sendo um polímero não biodegradável, este pode-se acumular

e provocar citotoxicidade. Considerando que, durante uma terapia génica possam ser necessárias administrações repetidas e que existe sempre preferência por métodos que não induzam citotoxicidade, a utilização de polímeros biodegradáveis como vetores, apresenta-se como uma alternativa vantajosa frente aos não biodegradáveis <sup>[51]</sup>.

### **4.3. Nanopartículas híbridas lípido-polímero (LPHNPs)**

As nanopartículas híbridas lípido-polímero geralmente referem-se a nanopartículas compostas por componentes de polímeros e lípidos. Visto que estas nanopartículas híbridas aproveitam as características complementares dos materiais lipídicos e poliméricos, são consideradas plataformas promissoras para a entrega de mRNA. Estas têm sido particularmente úteis na luta contra doenças de foro oncológico <sup>[61]</sup>. Sendo que tornam possível a entrega de dois ou mais medicamentos quimioterapêuticos com diferentes propriedades físico-químicas (hidrofóbicos e hidrofílicos) num único veículo de entrega. Algumas das características favoráveis deste tipo de nanopartículas incluem alta capacidade de carga de fármacos, alta estabilidade, biocompatibilidade, tempo de circulação prolongado e propriedades de controlo da libertação do fármaco <sup>[62]</sup>. Nos últimos anos, várias novas aplicações para as LPHNPs têm sido demonstradas, como por exemplo para entrega de mRNA ao tecido pulmonar, no entanto a utilização destes vetores fora do campo da oncologia ainda está em estágios iniciais <sup>[63]</sup>.

## **5. Aplicações de mRNA em terapia génica**

### **5.1. IVT mRNA em terapias de substituição proteica**

Muitas doenças são causadas pela ausência parcial ou completa de uma única proteína. Alternativamente, a proteína pode estar presente, mas com as suas funções diminuídas <sup>[27]</sup>. Tradicionalmente, recorrem-se a terapias proteicas para colmatar este tipo de disfunções <sup>[64]</sup>.

Embora a administração da proteína desejada já tenha sido aplicada com sucesso numa ampla variedade de doenças, ainda existem numerosas condições em que o uso de proteínas recombinantes não é aplicável. Isto deve-se à semi-vida curta das proteínas administradas, o que, combinado com a sua instabilidade e possível imunogenicidade, impedem a generalização desta abordagem. Outro aspeto crucial negativo deste método é a sua ineligibilidade para a substituição de proteínas intracelulares, como fatores de transcrição e outras moléculas reguladoras <sup>[30]</sup>. Adicionalmente, existem problemas intrínsecos nos processos de produção

de proteínas. Por exemplo, a produção em larga escala requer instalações complexas e etapas adicionais de controlo e garantia de qualidade. Além disso, após a produção, o armazenamento a frio de medicamentos à base de proteínas é geralmente necessário, de forma a que se mantenha a sua integridade antes da administração <sup>[11]</sup>.

Assim sendo, nestes cenários, a entrega de mRNA que codifica a proteína pode ser preferível, quando comparados com as terapias proteicas convencionais <sup>[27]</sup>. A utilização de mRNA permite a expressão de proteínas de alta qualidade a partir do próprio organismo do doente, sem a necessidade de instalações de produção complexas. Além disso, o armazenamento de material genético é, geralmente, mais conveniente do que o das proteínas, sendo que um simples processo de liofilização permite o armazenamento a longo prazo sem a necessidade de refrigeração <sup>[11]</sup>.

Porém, a terapia com mRNA tem sido associada a efeitos secundários, uma vez que o mRNA pode ser clivado por RNases, desencadeando respostas imunitárias através da ativação de recetores tipo *Toll-like* (TLR). Ao contrário do que acontece com as vacinas de mRNA, neste tipo de terapia é desvantajoso a indução de uma resposta imunitária, uma vez que isso interrompe a síntese proteica e acelera a degradação de mRNA. Desta forma, têm vindo a ser desenvolvidas estratégias de maneira a mitigar as respostas imunitárias derivadas desta abordagem terapêutica, como por exemplo, a utilização de mRNAs com nucleótidos modificados <sup>[30,27]</sup>.

## 5.2. Vacinas de mRNA contra doenças infecciosas

A vacinação é a intervenção de saúde pública mais eficaz na prevenção da propagação de doenças infecciosas. Campanhas de vacinação bem-sucedidas erradicaram doenças potencialmente fatais, como a varíola. A Organização Mundial da Saúde estima que as vacinas previnem 2 a 3 milhões de mortes por ano de tétano, tosse convulsa, influenza e sarampo <sup>[29]</sup>.

As vacinas de mRNA possuem várias vantagens em relação às vacinas convencionais. Ao contrário de algumas vacinas virais, o mRNA não integra o genoma, eliminando preocupações sobre mutagénese por inserção. A produção de mRNA é rápida, escalável, economicamente viável e, além disso, uma única vacina de mRNA pode codificar múltiplos antígenos, fortalecendo a resposta imune contra agentes patogénicos resistentes e possibilitando o direcionamento da vacina contra vários agentes patogénicos numa única formulação <sup>[29]</sup>. Em teoria, o mRNA pode ser sintetizado de forma a expressar praticamente qualquer antígeno proteico, proporcionando uma grande flexibilidade para o *design* de antígenos. Em conjunto com as aplicações atuais de inteligência artificial, que permitem um



grande avanço na previsão da estrutura de proteínas com base em sequências genéticas, o desenvolvimento de vacinas de mRNA contra doenças infecciosas será um processo mais preciso, rápido e eficiente, levando a uma abordagem personalizada e, conseqüentemente, mais eficiente no combate contra doenças infecciosas [65].

Atualmente, as vacinas de mRNA têm sido intensivamente investigadas e desenvolvidas para o combate de doenças altamente infecciosas, como o SARS-CoV-2, o vírus da gripe, o vírus Zika, o vírus da raiva e o HIV [4].

### **5.3. Vacinas de mRNA para imunoterapia de cancro**

Com quase 10 milhões de mortes por ano, o cancro continua a ser uma das principais causas de morte em todo o mundo [66]. Através da estimulação do sistema imunitário, a imunoterapia tem-se apresentado como uma modalidade de tratamento promissora no combate contra o cancro. Têm sido desenvolvidas vacinas contra o cancro, com base em mRNA que demonstram resultados encorajadores com base na sua eficácia e segurança [4]. Estas vacinas, têm como alvo os antigénios tumorais, de forma a provocarem respostas imunitárias com o potencial de suprimir o crescimento do tumor e, até, erradicarem o mesmo [28]. Desta forma, as vacinas de mRNA contra o cancro, oferecem a possibilidade de um tratamento específico, seguro e tolerável, em comparação com outras imunoterapias [67].

Assim como nas outras modalidades terapêuticas com base em mRNA, também as vacinas de mRNA para imunoterapia contra o cancro apresentam várias vantagens, tais como: produção rápida, escalável, flexível e de baixo custo; ausência de potencial oncogénico; boa tolerância e capacidade de provocar uma resposta imunitária robusta [28]. No entanto, apesar do considerável esforço de pesquisa no desenvolvimento de vacinas contra o cancro, a transposição destas em terapias clínicas eficazes tem sido desafiante devido á grande diversidade de antigénios tumorais e a produção de respostas imunitárias relativamente fracas [68].

Na Tabela 2, apresentam-se algumas das terapias de mRNA atualmente em desenvolvimento.

**Tabela 2:** Terapias de mRNA atualmente em desenvolvimento [4].

<b>Terapias de mRNA em desenvolvimento</b>			
<b>Área Terapêutica</b>	<b>Estratégia terapêutica</b>	<b>Indicação</b>	<b>Empresa</b>
<b>Doenças infecciosas</b>	Vacina	COVID-19	Moderna <sup>®</sup> , BioNTech <sup>®</sup> , Curevac <sup>®</sup> , Sirnaomics <sup>®</sup> , eTheRNA <sup>®</sup> , Walvax <sup>®</sup> , Translate Bio <sup>®</sup> , Ethris <sup>®</sup> , Arcturus <sup>®</sup> , Tiba <sup>®</sup> , Acuitas <sup>®</sup> , StemiRNA <sup>®</sup> , RNACure <sup>®</sup> , Abogen <sup>®</sup> , Precision NanoSystems <sup>®</sup> , Longuide Limited Lab <sup>®</sup>
		Influenza	Moderna <sup>®</sup> , BioNTech <sup>®</sup> , Curevac <sup>®</sup> , Sirnaomics <sup>®</sup> , Arcturus <sup>®</sup> , Tiba <sup>®</sup> , StemiRNA <sup>®</sup> , RNACure <sup>®</sup>
		Vírus sincicial respiratório	Moderna <sup>®</sup> , Curevac <sup>®</sup> , Ethris <sup>®</sup> , RNACure <sup>®</sup>
		Vírus da imunodeficiência humana	Moderna <sup>®</sup> , BioNTech <sup>®</sup> , eTheRNA <sup>®</sup> , Argos <sup>®</sup>
		Raiva	Curevac <sup>®</sup> , Precision NanoSystems <sup>®</sup>
		Vírus do papiloma humano	Sirnaomics <sup>®</sup> , eTheRNA <sup>®</sup> , StemiRNA <sup>®</sup>
		Malária	BioNTech <sup>®</sup> , Curevac <sup>®</sup> , eTheRNA <sup>®</sup>
		Vírus Epstein–Barr	Moderna <sup>®</sup> , StemiRNA <sup>®</sup>
		Tuberculose	BioNTech <sup>®</sup> , StemiRNA <sup>®</sup>
		Citomegalovirus	Moderna <sup>®</sup> , Rhegen <sup>®</sup>
		Herpes zoster	Abogen <sup>®</sup>
		Vírus Zika	Moderna <sup>®</sup>
		Hepatite B	Sirnaomics <sup>®</sup>
		Febre Amarela	Curevac <sup>®</sup>
		Parainfluenza	Moderna <sup>®</sup>

		Metapneumovírus	Moderna®
		Rotavírus	Curevac®
		Vírus Nipah	Moderna®
	Anticorpo	COVID-19	BioNTech®, Sirnaomics®
		Vírus Chicungunha	Moderna®
Edição Genética	Vírus da imunodeficiência humana	Sangamo®	
<b>Oncologia</b>	Vacina	Melanoma	BioNTech®, Curevac®, eTheRNA®
		Carcinoma de pulmão de células não pequenas	BioNTech®, Sirnaomics®
		Cancro Cervical	Sirnaomics®, eTheRNA®
		Cancro da Mama	Sirnaomics®
		Cancro do Ovário	BioNTech®
		Cancro do Fígado	Sirnaomics®
		Cancro do Estômago	eTheRNA®
		Cancro do pâncreas	Sirnaomics®
		Cancro colorretal	BioNTech®, Sirnaomics®
		Cancro da bexiga	Sirnaomics®
		Cancro da próstata	BioNTech®
		Cancro da cabeça e do pescoço	BioNTech®, Curevac®
		Carcinoma adenoide quístico	Curevac®
		Carcinoma espinocelular	Curevac®, Sirnaomics®
		Carcinoma basocelular	Sirnaomics®
		Carcinoma de células renais	eTheRNA®, Argos®
		Leucemia mieloide aguda (LMA)	StemiRNA®

	CAR-T	Cancro do pâncreas	BioNTech®
	Anticorpo	Cancro do pâncreas	BioNTech®
<b>Doenças Genéticas</b>	Substituição proteica	Fibrose Cística	Moderna®, Translate Bio®, Arcturus®
		Acidemia propiónica	Moderna®
		Aciduria metilmalónica	Moderna®
		Doença de Von Gierke	Moderna®
		Fenilcetonúria	Moderna®
		CN-I	Moderna®
		Deficiência da ornitina transcarbamilase	Arcturus®
		Hemofilia	Sirnaomics®
<b>Desordens Metabólicas</b>	Substituição proteica	Diabetes tipo 2	Moderna®
<b>Doenças Cardiovasculares</b>	Substituição proteica	Hipercolesterolemia	Sirnaomics®
		Isquemia Miocárdica	Moderna®
<b>Fibrose</b>	Substituição proteica	Cicatriz hipertrófica	Sirnaomics®
		Fibrose Hepática	Sirnaomics®
		Fibrose Pulmonar	Sirnaomics®
		Colangite esclerosante primária (CEP)	Sirnaomics®
		Anemia	In-Cell-Art®

## 6. Discussão

Passaram cerca de três décadas desde que foi proposta a utilização de terapia gênica como um método de tratamento para doenças que se apresentavam difíceis de tratar ou até mesmo incuráveis. Tendo em conta os produtos atualmente aprovados e aqueles ainda a aguardar aprovação, bem como os numerosos ensaios clínicos nesta área, a terapia gênica apresenta um futuro promissor. Embora, esta via terapêutica esteja maioritariamente a ser explorada para o tratamento de doenças de foro oncológico, é também atualmente estudada para aplicação em doenças infecciosas como a SIDA, malária e vírus do papiloma humano (HPV), bem como doenças adquiridas como doença vascular periférica, osteoartrite, retinopatias, doença arterial coronária, insuficiência cardíaca, rinite alérgica, doença de alzheimer, entre outras. Embora esta abordagem seja extraordinariamente promissora, o seu *design*, síntese e aplicações são temas complexos que vêm acompanhados de desafios únicos. Entre estes contam-se as respostas imunitárias desencadeadas por vetores que podem limitar a eficiência da terapia, por outro lado é crucial mitigar os efeitos *off-target* e existem ainda considerações éticas em torno de terapia gênica que devem ser consideradas e devidamente avaliadas.

Relativamente à síntese de DNA, por um lado os compostos intervenientes durante o processo de síntese e montagem podem introduzir erros nas sequências de aminoácidos. Por outro, as próprias tecnologias utilizadas para a síntese de oligonucleótidos não são perfeitas. Durante a síntese de oligonucleótidos, conclui-se que, atualmente, a síntese de oligonucleótidos com base em coluna resulta em oligonucleótidos de maior qualidade, no entanto esta é uma técnica mais dispendiosa. Já a síntese de oligonucleótidos com base em microarranjos é significativamente mais económica e permite um maior número de sequências únicas produzidas numa única execução de síntese. No entanto a quantidade de DNA sintetizado é muito menor do que aquele que seria necessário para uma produção em larga escala e são de qualidade inferior (são propensos a mais erros nas sequências dos aminoácidos) quando comparados com aqueles que são gerados através de métodos baseados em coluna.

Dada a atratividade dos métodos de síntese de oligonucleótidos baseados em microarranjos, têm-se vindo a desenvolver inovações que visam melhorar a qualidade, a eficiência e a escalabilidade destes métodos. A utilização de técnicas de síntese de oligonucleótidos baseadas em microarranjo, combinadas com protocolos de síntese automatizada e melhorias na qualidade do DNA sintético, têm dado passos significativos rumo a este objetivo. O desenvolvimento contínuo de técnicas eficientes de síntese de DNA resultam numa alta disponibilidade de DNA sintético cada vez mais acessível.

Quanto ao uso clínico de mRNA para fins terapêuticos, este requer uma tradução adequada do mRNA nas células de interesse sem despoletar uma resposta imunológica indesejada. Porém, alcançar este objetivo requer superar vários desafios relacionados com a síntese e entrega do mRNA. Após a síntese, nem sempre os métodos de purificação de mRNA têm sucesso na remoção de impurezas, resultando numa eficácia terapêutica reduzida e provocando respostas imunológicas indesejadas. Após a administração, o mRNA pode ser degradado por nucleases, removido por fagocitose de macrófagos ou eliminado por filtração renal. Além destes fatores, o mRNA é um polinucleótido negativamente carregado de grande dimensão, o que por si torna difícil a penetração das membranas celulares (que são também carregadas negativamente). Adicionalmente, o potencial imunoestimulatório do mRNA exógeno é outro grande obstáculo para a sua utilização clínica. Com o objetivo de ultrapassar as limitações expostas, várias abordagens têm sido tomadas. Por exemplo, têm-se desenvolvido *designs* inovadores de mRNA para superar os desafios referentes à estabilidade e à imunoestimulação. Além disso, algumas destas dificuldades podem ser resolvidas através da utilização de determinados mecanismos de entrega, cujo *design* requer que estes protejam as moléculas de mRNA de degradação e facilitem a penetração de barreiras biológicas.

No entanto, sucessos recentes vêm consolidar o interesse da utilização de mRNA para fins terapêuticos. É uma molécula que demonstra alto potencial na luta contra o cancro, resultando nestas doenças como o alvo principal da maioria dos ensaios clínicos de terapia génica.

Um dos fatores cruciais que ditam o sucesso da terapia génica prende-se com a escolha do mecanismo de entrega. Conforme o exposto no presente documento, estes podem ser categorizados principalmente em dois grupos: sistemas de entrega virais e sistemas físico-químicos não-virais. Apesar da grande eficiência de transdução e capacidade de integração dos vetores virais, há também desvantagens inerentes à utilização destes: as preocupações que surgem relativamente à sua segurança, capacidade de acondicionamento reduzida que limita o acondicionamento do DNA terapêutico, complexidade e custos de produção. Foram estas considerações que levaram à busca de alternativas recorrendo ao desenvolvimento de vetores não-virais. Apesar dos efeitos dos sistemas de entrega não-virais serem, muitas vezes, transitórios e menos eficientes em comparação com sistemas virais, estes vetores estão atualmente a ser desenvolvidos e aperfeiçoados para que se consigam melhorias na sua durabilidade e potência, sem comprometer a sua segurança.

A terapia génica é uma modalidade terapêutica que eventualmente fará parte dos cuidados de saúde padrão para uma variedade de doenças diferentes. Embora ainda existam

alguns desafios a superar, e muitas questões a considerar, o potencial impacto da terapia génica é imenso, apresentando possíveis curas para inúmeras doenças, até agora, incuráveis, revolucionando totalmente a maneira como tratamos determinados tipos de condições de saúde.

## 7. Referências Bibliográficas

- [1] Collins, F. S., Morgan, M., & Patrinos, A. (2003). The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science* (New York, N.Y.), 300(5617), 286–290. <https://doi.org/10.1126/science.1084564>
- [2] Herzog, R. W., Cao, O., & Srivastava, A. (2010). Two decades of clinical gene therapy—success is finally mounting. *Discovery medicine*, 9(45), 105–111.
- [3] Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., Greenblatt, J. J., Rosenberg, S. A., Klein, H., Berger, M., Mullen, C. A., Ramsey, W. J., Muul, L., Morgan, R. A., & Anderson, W. F. (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* (New York, N.Y.), 270(5235), 475–480. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.475>
- [4] Qin, S., Tang, X., Chen, Y., Chen, K., Fan, N., Xiao, W., Zheng, Q., Li, G., Teng, Y., Wu, M., & Song, X. (2022). mRNA-based therapeutics: powerful and versatile tools to combat diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 166. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01007-w>
- [5] Hazel Aranha, E., & Vega-Mercado, H. (2023). *Handbook of Cell and Gene Therapy; From Proof-of-Concept through Manufacturing to Commercialization*.
- [6] O'Donoghue, P., & Heinemann, I. U. (2019). Synthetic DNA and RNA Programming. *Genes*, 10(7), 523. <https://doi.org/10.3390/genes10070523>
- [7] Kim, J., & Franco, E. (2020). RNA nanotechnology in synthetic biology. *Current opinion in biotechnology*, 63, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.016>
- [8] BATES, Sarah A. - Deoxyribonucleic Acid (DNA). 21 Ag. 2023. [Consultado a 21 de agosto de 2023]. Disponível em <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Deoxyribonucleic-Acid>.
- [9] SEN, Shurjo K. - Ribonucleic Acid (RNA). 21 Ag. 2023. [Consultado a 21 de agosto de 2023]. Disponível em <https://www.genome.gov/genetics-glossary/RNA-Ribonucleic-Acid>.
- [10] Wang D, Farhana A. Biochemistry, RNA Structure. 29 Jul 2023. [Consultado a 21 de agosto de 2023]. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558999/>
- [11] Kwon, H., Kim, M., Seo, Y., Moon, Y. S., Lee, H. J., Lee, K., & Lee, H. (2018). Emergence of synthetic mRNA: In vitro synthesis of mRNA and its applications in regenerative medicine. *Biomaterials*, 156, 172–193. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.034>



- [12] Mendell, J. R., Al-Zaidy, S. A., Rodino-Klapac, L. R., Goodspeed, K., Gray, S. J., Kay, C. N., Boye, S. L., Boye, S. E., George, L. A., Salabarria, S., Corti, M., Byrne, B. J., & Tremblay, J. P. (2021). Current Clinical Applications of In Vivo Gene Therapy with AAVs. In *Molecular Therapy* (Vol. 29, Issue 2, pp. 464–488). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.12.007>
- [13] Gonçalves, G. A. R., & Paiva, R. M. A. (2017). Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein* (Sao Paulo, Brazil), 15(3), 369–375. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082017RB4024>
- [14] Ormond, K. E., Mortlock, D. P., Scholes, D. T., Bombard, Y., Brody, L. C., Faucett, W. A., Garrison, N. A., Hercher, L., Isasi, R., Middleton, A., Musunuru, K., Shriner, D., Virani, A., & Young, C. E. (2017). Human Germline Genome Editing. In *American Journal of Human Genetics* (Vol. 101, Issue 2, pp. 167–176). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.06.012>
- [15] van Haasteren, J., Hyde, S. C., & Gill, D. R. (2018). Lessons learned from lung and liver in-vivo gene therapy: implications for the future. In *Expert Opinion on Biological Therapy* (Vol. 18, Issue 9, pp. 959–972). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1506761>
- [16] Santos, H. S., Rodrigues, L., Vera, L. N. P., Poletto, E., Filippi-Chiela, E., Dos Santos Bruschi, L. F. R., Schuh, R., & Baldo, G. (2021). In Situ Gene Therapy. *Current gene therapy*, 21(5), 406–430. <https://doi.org/10.2174/1566523221666210504103323>
- [17] Wasnik, V. B., & Thool, A. R. (2022). Ocular Gene Therapy: A Literature Review With Focus on Current Clinical Trials. *Cureus*, 14(9), e29533. <https://doi.org/10.7759/cureus.29533>
- [18] Arabi, F., Mansouri, V., & Ahmadbeigi, N. (2022). Gene therapy clinical trials, where do we go? An overview. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 153). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113324>
- [19] Aslesh, T., & Yokota, T. (2022). Restoring SMN Expression: An Overview of the Therapeutic Developments for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *Cells*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/cells11030417>
- [20] Arjmand, B., Larijani, B., Sheikh Hosseini, M., Payab, M., Gilany, K., Goodarzi, P., Parhizkar Roudsari, P., Amanollahi Baharvand, M., & Hoseini Mohammadi, N. sadat. (2020). The horizon of gene therapy in modern medicine: Advances and challenges. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1247, pp. 33–64). Springer. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2019\\_463](https://doi.org/10.1007/5584_2019_463)

- [21] Ruigrok, M. J. R., Frijlink, H. W., Melgert, B. N., Olinga, P., & Hinrichs, W. L. J. (2021). Gene therapy strategies for idiopathic pulmonary fibrosis: recent advances, current challenges, and future directions. In *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development* (Vol. 20, pp. 483–496). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.01.003>
- [22] Nishikubo, K., Murata, Y., Tamaki, S., Sugama, K., Imanaka-Yoshida, K., Yuda, N., Kai, M., Takamura, S., Sebald, W., Adachi, Y., & Yasutomi, Y. (2003). A single administration of interleukin-4 antagonistic mutant DNA inhibits allergic airway inflammation in a mouse model of asthma. *Gene Therapy*, 10(26), 2119–2125. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302131>
- [23] Rohner, E., Yang, R., Foo, K. S., Goedel, A., & Chien, K. R. (2022). Unlocking the promise of mRNA therapeutics. In *Nature Biotechnology* (Vol. 40, Issue 11, pp. 1586–1600). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01491-z>
- [24] Hughes, R. A., & Ellington, A. D. (2017). Synthetic DNA synthesis and assembly: Putting the synthetic in synthetic biology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023812>
- [25] Beaucage, S. L., & Jain, H. v. (2016). The Chemical Synthesis of DNA and RNA Oligonucleotides for Drug Development and Synthetic Biology Applications. In *Encyclopedia of Cell Biology* (Vol. 1, pp. 36–53). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.10007-0>
- [26] Beginner's Guide to Artificial DNA Synthesis | Azenta Life Sciences. [Consultado a 21 de agosto de 2023]. Disponível em <https://www.azenta.com/blog/beginner-guide-artificial-dna-synthesis>.
- [27] Rhoads, R. E. (2016). Synthetic mRNA: Production, introduction into cells, and physiological consequences. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1428, pp. 3–27). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3625-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3625-0_1)
- [28] Vishweshwaraiah, Y. L., & Dokholyan, N. v. (2022). mRNA vaccines for cancer immunotherapy. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1029069>
- [29] Chaudhary, N., Weissman, D., & Whitehead, K. A. (2021). mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 20, Issue 11, pp. 817–838). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00283-5>

- [30] Vavilis, T., Stamoula, E., Ainatzoglou, A., Sachinidis, A., Lamprinou, M., Dardalas, I., & Vizirianakis, I. S. (2023). mRNA in the Context of Protein Replacement Therapy. In *Pharmaceutics* (Vol. 15, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010166>
- [31] Radhakrishnan P. Iyer, Serge L. Beaucage (1999). Oligonucleotide Synthesis. In *Comprehensive Natural Products Chemistry* (Vol. 7, pp. 105-152). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-091283-7.00126-0>
- [32] Song, L. F., Deng, Z. H., Gong, Z. Y., Li, L. L., & Li, B. Z. (2021). Large-Scale de novo Oligonucleotide Synthesis for Whole-Genome Synthesis and Data Storage: Challenges and Opportunities. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.689797>
- [33] Kosuri, S., & Church, G. M. (2014). Large-scale de novo DNA synthesis: Technologies and applications. In *Nature Methods* (Vol. 11, Issue 5, pp. 499–507). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2918>
- [34] Tang, L. (2018). An enzymatic oligonucleotide synthesizer. In *Nature Methods* (Vol. 15, Issue 8, p. 568). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0096-x>
- [35] Jensen, M. A., & Davis, R. W. (2018). Template-Independent Enzymatic Oligonucleotide Synthesis (TiEOS): Its History, Prospects, and Challenges. In *Biochemistry* (Vol. 57, Issue 12, pp. 1821–1832). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00937>
- [36] Lee, B. R., Cho, S., Song, Y., Kim, S. C., & Cho, B. K. (2013). Emerging tools for synthetic genome design. In *Molecules and Cells* (Vol. 35, Issue 5, pp. 359–370). Korean Society for Molecular and Cellular Biology. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0127-5>
- [37] Anzalone, A. v., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., Chen, P. J., Wilson, C., Newby, G. A., Raguram, A., & Liu, D. R. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576(7785), 149–157. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
- [38] Huang, X., Kong, N., Zhang, X., Cao, Y., Langer, R., & Tao, W. (2022). The landscape of mRNA nanomedicine. In *Nature Medicine* (Vol. 28, Issue 11, pp. 2273–2287). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02061-1>
- [39] Ramaswamy, S., Tonnu, N., Tachikawa, K., Limphong, P., Vega, J. B., Karmali, P. P., Chivukula, P., & Verma, I. M. (2017). Systemic delivery of factor IX messenger RNA for protein replacement therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(10), E1941–E1950. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619653114>

- [40] Nakanishi, H., & Itaka, K. (2022). Synthetic mRNA for ex vivo therapeutic applications. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 44, 100447. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2022.100447>
- [41] Castillo-Hair, S. M., & Seelig, G. (2022). Machine Learning for Designing Next-Generation mRNA Therapeutics. *Accounts of Chemical Research*, 55(1), 24–34. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00621>
- [42] Paunovska, K., Loughrey, D., & Dahlman, J. E. (2022). Drug delivery systems for RNA therapeutics. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 23, Issue 5, pp. 265–280). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00439-4>
- [43] Kang, D. D., Li, H., & Dong, Y. (2023). Advancements of in vitro transcribed mRNA (IVT mRNA) to enable translation into the clinics. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 199). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114961>
- [44] Zhong, Z., McCafferty, S., Opsomer, L., Wang, H., Huysmans, H., de Temmerman, J., Lienenklaus, S., Portela Catani, J. P., Combes, F., & Sanders, N. N. (2021). Corticosteroids and cellulose purification improve, respectively, the in vivo translation and vaccination efficacy of sa-mRNAs. *Molecular Therapy*, 29(4), 1370–1381. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.01.023>
- [45] Leppek, K., Byeon, G. W., Kladwang, W., Wayment-Steele, H. K., Kerr, C. H., Xu, A. F., Kim, D. S., Topkar, V. V., Choe, C., Rothschild, D., Tiu, G. C., Wellington-Oguri, R., Fujii, K., Sharma, E., Watkins, A. M., Nicol, J. J., Romano, J., Tunguz, B., Diaz, F., Cai, H., ... Das, R. (2022). Combinatorial optimization of mRNA structure, stability, and translation for RNA-based therapeutics. *Nature communications*, 13(1), 1536. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28776-w>
- [46] Cao, J., Novoa, E. M., Zhang, Z., Chen, W. C. W., Liu, D., Choi, G. C. G., Wong, A. S. L., Wehrspau, C., Kellis, M., & Lu, T. K. (2021). High-throughput 5' UTR engineering for enhanced protein production in non-viral gene therapies. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24436-7>
- [47] Orlandini von Niessen, A. G., Poleganov, M. A., Rechner, C., Plaschke, A., Kranz, L. M., Fesser, S., Diken, M., Löwer, M., Vallazza, B., Beissert, T., Bukur, V., Kuhn, A. N., Türeci, Ö., & Sahin, U. (2019). Improving mRNA-Based Therapeutic Gene Delivery by Expression-Augmenting 3' UTRs Identified by Cellular Library Screening. *Molecular Therapy*, 27(4), 824–836. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.12.011>

- [48] Karikó, K., Muramatsu, H., Ludwig, J., & Weissman, D. (2011). Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Research*, 39(21). <https://doi.org/10.1093/nar/gkr695>
- [49] Muttach, F., Muthmann, N., & Rentmeister, A. (2017). Synthetic mRNA capping. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 13, 2819–2832. <https://doi.org/10.3762/bjoc.13.274>
- [50] Mellott, A. J., Forrest, M. L., & Detamore, M. S. (2013). Physical non-viral gene delivery methods for tissue engineering. In *Annals of Biomedical Engineering* (Vol. 41, Issue 3, pp. 446–468). <https://doi.org/10.1007/s10439-012-0678-1>
- [51] Zu, H., & Gao, D. (2021). Non-viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects. In *AAPS Journal* (Vol. 23, Issue 4). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1208/s12248-021-00608-7>
- [52] Bulcha, J. T., Wang, Y., Ma, H., Tai, P. W. L., & Gao, G. (2021). Viral vector platforms within the gene therapy landscape. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 6, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00487-6>
- [53] Goverdhana, S., Puntel, M., Xiong, W., Zirger, J. M., Barcia, C., Curtin, J. F., Soffer, E. B., Mondkar, S., King, G. D., Hu, J., Sciascia, S. A., Candolfi, M., Greengold, D. S., Lowenstein, P. R., & Castro, M. G. (2005). Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: Progress and future challenges. In *Molecular Therapy* (Vol. 12, Issue 2, pp. 189–211). <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.03.022>
- [54] Nayerossadat, N., Ali, P., & Maedeh, T. (2012). Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced Biomedical Research*, 1(1), 27. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.98152>
- [55] Akinc, A., Maier, M. A., Manoharan, M., Fitzgerald, K., Jayaraman, M., Barros, S., Ansell, S., Du, X., Hope, M. J., Madden, T. D., Mui, B. L., Semple, S. C., Tam, Y. K., Ciufolini, M., Witzigmann, D., Kulkarni, J. A., van der Meel, R., & Cullis, P. R. (2019). The Onpatro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. In *Nature Nanotechnology* (Vol. 14, Issue 12, pp. 1084–1087). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0591-y>
- [56] Gillmore, J. D., Gane, E., Taubel, J., Kao, J., Fontana, M., Maitland, M. L., Seitzer, J., O'Connell, D., Walsh, K. R., Wood, K., Phillips, J., Xu, Y., Amaral, A., Boyd, A. P., Cehelsky, J. E., McKee, M. D., Schiermeier, A., Harari, O., Murphy, A., ... Leibold, D. (2021). CRISPR-

Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. *New England Journal of Medicine*, 385(6), 493–502. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2107454>

**[57]** Get the Facts on the Condition That ONPATTRO® (patisiran) Is Used to Treat. [Consultado a 21 de agosto de 2023]. Disponível em <https://www.onpattro.com/disease-overview>

**[58]** See How ONPATTRO® (patisiran) Works. [Consultado a 21 de agosto de 2023]. Disponível em <https://www.onpattro.com/about-onpattro>

**[59]** Chira, S., Jackson, C. S., Oprea, I., Ozturk, F., Pepper, M. S., Diaconu, I., Braicu, C., Raduly, L. Z., Calin, G. A., & Berindan-Neagoe, I. (2015). Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. *Oncotarget*, 6(31), 30675–30703. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5169>

**[60]** Jin, L., Zeng, X., Liu, M., Deng, Y., & He, N. (2014). Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. In *Theranostics* (Vol. 4, Issue 3, pp. 240–255). <https://doi.org/10.7150/thno.6914>

**[61]** Zhong, Y., Du, S., & Dong, Y. (2023). mRNA delivery in cancer immunotherapy. In *Acta Pharmaceutica Sinica B* (Vol. 13, Issue 4, pp. 1348–1357). Chinese Academy of Medical Sciences. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.03.001>

**[62]** Chakravarty, M., & Vora, A. (2021). Nanotechnology-based antiviral therapeutics. In *Drug Delivery and Translational Research* (Vol. 11, Issue 3, pp. 748–787). Springer. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00818-0>

**[63]** Mukherjee, A., Waters, A. K., Kalyan, P., Achrol, A. S., Kesari, S., & Yenugonda, V. M. (2019). Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a next generation drug delivery platform: State of the art, emerging technologies, and perspectives. In *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 14, pp. 1937–1952). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S198353>

**[64]** Dimitrov, D. S. (2012). Therapeutic proteins. *Methods in Molecular Biology*, 899, 1–26. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-921-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-921-1_1)

**[65]** Xu, S., Yang, K., Li, R., & Zhang, L. (2020). Mrna vaccine era—mechanisms, drug platform and clinical prospection. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 18, pp. 1–35). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21186582>

**[66]** Sobhani, N., Scaggiante, B., Morris, R., Chai, D., Catalano, M., Tardiel-Cyril, D. R., Neeli, P., Roviello, G., Mondani, G., & Li, Y. (2022). Therapeutic cancer vaccines: From biological

mechanisms and engineering to ongoing clinical trials. In *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 109). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2022.102429>

**[67]** Miao, L., Zhang, Y., & Huang, L. (2021). mRNA vaccine for cancer immunotherapy. In *Molecular Cancer* (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01335-5>

**[68]** Deng, Z., Tian, Y., Song, J., An, G., & Yang, P. (2022). mRNA Vaccines: The Dawn of a New Era of Cancer Immunotherapy. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.887125>

**[69]** Miller, M. B., & Tang, Y. W. (2009). Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 22, Issue 4, pp. 611–633). <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-09>

**[70]** DNA Oligonucleotide Synthesis. [Consultado a 1 de Setembro de 2023]. Disponível em <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/technical-documents/technical-article/genomics/pcr/dna-oligonucleotide-synthesis>>