



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria Beatriz Vicente Calhau Quito

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Vacinas de mRNA para a imunoterapia do cancro” referentes à unidade curricular “Estágio”, sob a orientação da Doutora Élia Alves, da Doutora Andreia Fernandes e do Professor Doutor João Nuno Moreira, 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



UNIVERSIDADE D COIMBRA

Maria Beatriz Vicente Calhau Quito

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Vacinas de mRNA para a imunoterapia do cancro” referentes à unidade curricular “Estágio”, sob a orientação da Doutora Élia Alves, Doutora Andreia Fernandes, e do Professor Doutor João Nuno Moreira, 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

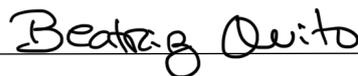
O trabalho de revisão bibliográfica - *Monografia* - teve o apoio do projeto CInTech - *Technological Hub for Innovation, Translation and Industrialization of Complex Injectable Drugs* -, com a referência n.º C644865576-00000005, co-financiado pela Componente C5 - Capitalização e Inovação Empresarial integrada na Dimensão Resiliência do Plano de Recuperação e Resiliência (PRR), através do fundo NextGenerationEU.



Eu, Maria Beatriz Vicente Calhau Quito, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2018293970, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Vacinas de mRNA para a imunoterapia do cancro” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular 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, 7 de setembro de 2023.

A handwritten signature in black ink that reads "Beatriz Quito". The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal line.

(Maria Beatriz Vicente Calhau Quito)

Agradecimentos

Aos meus pais, um obrigada não chega por me incentivarem sempre a dar o meu melhor e a superar as adversidades que aparecem! A pessoa que sou hoje deve-se a eles.

À minha restante família, em especial às minhas irmãs, por me terem acompanhado e apoiado incondicionalmente durante todo o meu percurso académico!

À Tecas, Maria, Bia, Pascoal, Simões, PP, Mafalda, Edu por terem partilhado comigo este percurso académico, sem vocês não teria sido o mesmo! Desde os jantares de grupo à partilha de dúvidas em épocas de exames, estas memórias nunca serão esquecidas.

Ao grupo da santa terrinha, que mesmo estando longe a amizade permaneceu a mesma e o apoio constante que senti ao longo destes anos.

Ao meu orientador Professor Doutor João Nuno Moreira, por ser um exemplo de profissionalismo e pelo tempo despendido na minha orientação!

Ao departamento dos Assuntos Regulamentares do Grupo Tecnimed, por tudo o que me ensinaram e pela forma como me acolheram. Sem dúvida que teve um impacto marcante como primeiro contacto na Indústria Farmacêutica.

À Farmácia Reis Barata Odivelas, por me terem ensinado o papel do farmacêutico perante uma sociedade, assim como os ensinamentos pautados e a alegria que me proporcionaram ao estar na Farmácia Comunitária.

À FFUC, por ter sido casa durante 5 anos, por ter sido motivo de risos e choros, mas principalmente por ter um grande ensino.

A ti Coimbra, que terás sempre um lugar guardado no meu coração!

Índice

Capítulo I – Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Lista de Abreviaturas	7
1. Introdução	8
2. Grupo Tecnimede	8
3. Análise SWOT.....	9
3.1. Pontos Fortes.....	10
3.1.1. Acolhimento e integração no departamento.....	10
3.1.2. Diversidade de tarefas.....	10
3.1.3. Utilização de plataformas informáticas e softwares	11
3.1.4. Aperfeiçoamento do inglês.....	12
3.2. Pontos Fracos.....	12
3.2.1. Pouco contacto com outros departamentos/empresas/clientes	12
3.3. Oportunidades.....	13
3.3.1. Participação em formações do departamento	13
3.4. Ameaças.....	13
3.4.1. Resposta demorada de outros departamentos/empresas.....	13
3.4.2. Durabilidade do estágio	14
4. Conclusão.....	14
Bibliografia.....	15

Capítulo II – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	17
1. Introdução	18
2. Análise SWOT.....	19
2.1. Pontos fortes.....	19
2.1.1. Integração na equipa e relação com os utentes.....	19
2.1.2. Medicação individual para lares e utentes	20
2.1.3. Novo Sifarma [®]	20
2.1.4. Manipulados.....	21
2.2. Pontos fracos.....	21
2.2.1. Dermofarmácia e cosmética	21
2.2.2. Nomes comerciais dos medicamentos.....	21
2.3. Oportunidades.....	22
2.3.1. Formações internas e externas.....	22
2.4. Ameaças.....	22
2.4.1. Ruturas de stock.....	22
2.4.2. Venda de MNSRM fora das farmácias.....	23
3. Casos Clínicos.....	23

Caso I.....	23
Caso II.....	24
Caso III.....	24
Caso IV.....	25
Caso V.....	25
4. Conclusão.....	26
Bibliografia.....	27
Anexo I.....	28
<u>Capítulo III – Vacinas de mRNA para a imunoterapia do cancro</u>	
Resumo.....	32
Abstract.....	33
Lista de Abreviaturas.....	34
1. Introdução.....	35
2. Diferentes vacinas para o cancro.....	36
3. mRNA.....	38
3.1. Otimização do mRNA.....	39
4. Mecanismos das vacinas de mRNA para o cancro.....	39
4.1. Resposta imune adaptativa.....	39
4.2. Antígenos tumorais.....	41
5. Sistemas de entrega para as vacinas de mRNA.....	42
5.1. mRNA livre.....	43
5.2. Eletroporação para a administração de mRNA em células dendríticas ex-vivo	43
5.3. Protamina.....	44
5.4. Lipossomas e Nanopartículas lipídicas.....	45
5.5. Nanopartículas híbridas.....	47
5.6. Exossomas.....	48
6. Limitações das vacinas de mRNA.....	49
6.1. Toxicidade.....	49
6.2. Via de administração.....	49
6.3. Imunossupressão tumoral.....	50
6.3.1. Sobreexpressão de <i>immune checkpoint</i>	50
6.3.2. Células imunossupressoras.....	50
7. Ensaio clínico das vacinas de mRNA.....	51
7.1. Vacinas de mRNA personalizadas para o cancro.....	55
7.2. Vacinas de mRNA à base de células dendríticas.....	56
8. Conclusão.....	57
Bibliografia.....	58

Capítulo I

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Assuntos Regulamentares



Orientadora: Dra. Élia Alves

Lista de Abreviaturas

AIM - Autorização de Introdução no Mercado

CPP – Certificado de um Medicamento

eAF – *eletronic Application Form*

eCTD - *eletronic Common Technical Document*

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FI – Folheto Informativo

GTM – Grupo Tecnimede

RCM – Resumo das Características do Medicamento

1. Introdução

A Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra proporciona aos estudantes do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas a realização de um segundo estágio em outra área farmacêutica para além do estágio de cariz obrigatório em farmácia comunitária. A FFUC diferencia-se do resto das faculdades de farmácia do país ao ter parcerias com indústrias farmacêuticas e outras entidades externas, o que permite aos estudantes ter experiências e competências fora do ramo da farmácia comunitária e farmácia hospitalar.

Neste caso optei pela Indústria Farmacêutica, mais concretamente a área de assuntos regulamentares, visto que foi uma cadeira que me cativou bastante e me despertou interesse em perceber como iria aplicar os conhecimentos adquiridos e também aprender mais em relação a esta área.

O presente relatório tem como objetivo descrever o meu estágio iniciado a 9 de janeiro com término a 31 de março de 2023, durante o qual desempenhei funções no departamento de Assuntos Regulamentares no Grupo Tecnimede (GTM), sob a orientação da Dra. Élia Alves e coorientação da Dra. Rita Pedroso (pré-AIM Europa), Dra. Sofia Henriques (pós-AIM) e Dra. Susana Pardana e Dra. Leonor Dias (pré-AIM Internacional). O relatório de estágio está descrito sob a forma de análise SWOT (Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats), o que me permitiu realizar uma análise crítica do ponto de vista interno, tais como os pontos fortes e os pontos fracos. Mas também do ponto de vista externo que contempla as oportunidades que me foram proporcionadas e as ameaças sentidas ao longo do estágio.

2. Grupo Tecnimede

Em 1980, foi criado o GTM, estando neste momento sediado na Abrunheira (Sintra), Portugal. Este é composto por empresas farmacêuticas que incorporam todo o ciclo do medicamento para uso humano, tal como, investigação, desenvolvimento, produção e comercialização. As 4 empresas que constituem o grupo são: a Tecnimede, responsável pelos medicamentos inovadores, a Tecnigen que possui os medicamentos genéricos (Tecnigen, Pentafarma e Farmoz), a Tecnimede Consumer Healthcare e Farmoz Hospitalar.

O grupo ainda possui duas unidades fabris, a Atlantic Pharma, sediada também na Abrunheira e a Atlas Pharma, localizada em Marrocos. Para além disso, esta grande empresa 100% portuguesa tem-se expandido para outras zonas do mundo, tais como, Espanha,

Colômbia, Itália, Marrocos e Brasil. Possui também um campus de Investigação e Desenvolvimento Químico e Farmacêutico em Torres Vedras, denominado de Labor Qualitas.

Adicionalmente, tem diversas parcerias quer com Universidades nacionais quer com Universidades mundiais. Uma das parcerias é precisamente a Universidade de Coimbra, que, para além de ter um projeto atualmente a ser desenvolvido, o IMPUCT 2, que visa o desenvolvimento implantes poliméricos para libertação prolongada de fármacos, tem também o laboratório UpCells, para a produção de terapia celular¹.

3. Análise SWOT



3.1. Pontos Fortes (*streghts*)

3.1.1. Acolhimento e integração no departamento

No primeiro dia de estágio, fui apresentada a todo o departamento de Assuntos Regulamentares, o que me permitiu perceber toda a organização do departamento. Relativamente a este, que está sob a direção da Dra. Élia Alves, está dividido em gestão pré-AIM e pós-AIM. A equipa do pré-AIM está sub-dividida por regiões como: Europa, América do Sul e do Norte, Ásia, África e Médio Oriente. Enquanto a equipa do pós-AIM é responsável por todas as zonas do globo.

No decorrer do estágio, tive o prazer de privar com profissionais que sempre se demonstraram disponíveis para qualquer dúvida que me surgisse e procuravam sempre explicar todo o procedimento inerente ao trabalho que realizavam. Saí do estágio com uma ideia mais clara de qual é o papel do farmacêutico em Assuntos Regulamentares.

3.1.2. Diversidade de tarefas

No primeiro dia do estágio fui informada do planeamento que se seguia nos próximos 3 meses dentro do departamento, tendo primeiramente começado no pré-AIM europa, o que me permitiu ter uma noção geral do tipo de documentação necessária, da estrutura de um dossier e conhecimento da rede com que o GTM trabalha. Inicialmente, comecei por realizar tarefas mais básicas, porem extremamente necessárias, como o caso do resumo das características dos medicamentos (RCM), folheto informativo (FI), rotulagem e *bridging reports*, este relatório comprova que o FI do nosso produto é similar ao produto que considerámos como de referência. Posteriormente, passei a preencher os eletronic Application Forms (eAF), em que tinha que aceder aos módulos dos dossiers que estavam em construção para completar com a informação necessária no eAF. Já na fase final, deram-me a autonomia para fazer o dossier de raiz e por fim, submetê-lo na plataforma.

Posteriormente passei para o pós-AIM em que acompanhei a fase de alterações de preços e foi a tarefa que mais tempo ocupou enquanto estive nesta parte do departamento. Para além de ter estado a acompanhar a alteração de preços, ainda fiquei responsável por algumas alterações às AIMS, como é o caso de alterações Ib e Ia, que são alterações *minor*, o que deu para pôr em prática o que tinha aprendido nas aulas de Assuntos Regulamentares.

E por fim, no pré-AIM internacional, em que integrei projetos no Médio Oriente, África e América Latina, onde a documentação e a própria regulamentação dos países destes sítios

diferem da Europa. Existe a obrigatoriedade de apresentar certas declarações, ou a certificação/legalização de alguns documentos, como é o caso do certificado de um medicamento (CPP), estes certificados são necessários para que seja feito o registo ou exportação dos produtos para fora da união europeia. As tarefas realizadas no pré-AIM internacional foram muito diversas, desde verificar CPPs, ao preenchimento dos formulários e documentação requisitados para cada país e a elaboração de FI e RCM.

A passagem por estas 3 áreas teve uma sequência lógica, porque para perceber o conceito de uma alteração a uma AIM foi importante primeiramente ter a noção do que era a constituição de um dossier, desde a documentação necessária ao conteúdo desta. O caminho que percorri dentro do departamento deu-me uma visão de como era o quotidiano dos assuntos regulamentares, e que é estritamente necessário ter um conhecimento sólido da regulamentação inerente ao país onde se estivesse a submeter a AIM.

3.1.3. Utilização de plataformas informáticas e softwares

Tendo em conta o tipo de tarefas que desempenhei, foi-me permitido utilizar várias plataformas informáticas, quer de acesso público como de acesso restrito, após ter aprendido a funcionalidade das diversas plataformas, deram-me autonomia para aceder quando necessitasse de alguma informação.

Quanto às plataformas informáticas de acesso ao público, deram-me a liberdade de aceder a algumas plataformas da European Medicines Agency (EMA), como eSUBMISSION e em relação aos sites da internet, tive ainda a oportunidade de aceder ao INFARMED, à Heads of Medicine (HMA), ao Directorate for the Quality of Medicines (EDQM) e o Eudralex. Há plataformas e sites que já eram do meu conhecimento prévio, porém enquanto estive a estagiar consegui explorá-los mais e ter acesso às partes restritas de algumas plataformas como o caso do INFARMED. Em relação às plataformas do INFARMED, durante o meu período no pré AIM, pude aceder à plataforma que continha as informações sobre as cadeias de fabrico (SMUH-ALTER), plataforma esta que também tive que consultar durante o meu período no pós-AIM, e à plataforma da submissão de pedidos de AIM (SMUH-AIM) e quando estive no pós-AIM, pude aceder à submissão eletrónica de alterações (SMUH-ALTER). No que diz respeito à HMA, trabalhei com o *Common European Submission Portal* (CESP) em que há partilha de informação entre a empresa, neste caso GTM, e as autoridades regulamentares do país/países do projeto.

Um dos softwares de acesso restrito foi o *eletronic Common Technical Document* (eCTD) enquanto estava na parte do pré-AIM europa. Este software permite a compilação e posterior submissão ou alteração de AIM por via eletrónica dos documentos que constituem o dossier em formato CTD, que passou a ser obrigatório desde o início de 2019². Tive o obséquo de poder criar dois dossiers de raiz e perceber a extrema importância que tem no departamento de assuntos regulamentares.

O GTM trabalha com um software chamado GDOC, em que no período que passei pelo pré-AIM internacional tive que trabalhar com ele, pois todos os departamentos do grupo têm acesso e é a partir deste que é transmitido certos documentos entre os departamentos, em título de exemplo, quem realizava os estudos de estabilidade colocava o respetivo documento para ser inserido no modulo 3.2.P.8 do dossier de um produto e posteriormente alguém responsável pelo produto em questão descarregava o documento e colocava-o no dossier.

3.1.4. Aperfeiçoamento do inglês

No decurso do estágio, a maioria das tarefas que desempenhei eram em inglês, como traduzir RCM e FI, para além de que grande parte dos dossiers que se realizavam também iam ser para empresas fora de Portugal, a documentação necessária para a constituição deste também teria de constar em inglês. Posto isto, considero que consegui aperfeiçoar e ter conhecimentos de termos técnicos em inglês que anteriormente me eram desconhecidos.

3.2. Pontos Fracos (Weaknesses)

3.2.1. Pouco contacto com outros departamentos/empresas/clientes

Enquanto estagiária não tive a oportunidade de comunicar com outros departamentos ou entidades fora da empresa quando advinha a necessidade de pedir informação ou documentação. No entanto, tinha conhecimento dos e-mails que eram mandados a requerer informação e a sua posterior resposta. Como tinha acesso aos e-mails recebidos, permitiu-me perceber a importância da interligação do departamento com outros departamentos que constituem o GTM.

3.3. Oportunidades (Opportunities)

3.3.1. Participação em formações do departamento

Durante o meu estágio curricular, o departamento de registos realizou algumas formações, em que os oradores eram colaboradores do departamento e iam variando, o que achei um ponto bastante positivo por permitir que haja rotatividade nas pessoas que planeavam as diversas formações. Tive o privilégio de assistir à formação sobre os tipos de alterações que podiam existir a uma AIM; o enquadramento e registos de dispositivos médicos, produtos cosméticos e de higiene corporal e suplementos alimentares; e por último, a definição de eCTD e todo o procedimento a ele associado.

Estas formações foram bastante benéficas, visto que consegui consolidar conhecimentos existentes, como adquirir novos em determinados assuntos com os quais não houve a oportunidade de trabalhar, como foi o caso dos dispositivos médicos, produtos cosméticos e suplementos alimentares.

3.4. Ameaças (Threats)

3.4.1. Resposta demorada de outros departamentos/empresas

Para a elaboração de uma AIM ou até mesmo uma alteração à mesma, é necessária documentação por parte de outros departamentos, como o departamento de qualidade, ou até mesmo de outras empresas, como é o caso de informação por parte do fabricante de API. Como tal, a Tecnimedé está sempre dependente da colaboração e da resposta atempada por parte de outrem. Com isto, torna-se desafiante, pois existem prazos estipulados para a submissão dos documentos regulamentares necessários para a aprovação quer de uma AIM, quer de uma alteração à mesma.

Durante o meu período de estágio, existiram vários momentos em que necessitava de documentação para dar continuidade aos processos em vigor, no entanto, como havia atraso desta, acabava por ficar com tarefas inacabadas ou por vezes ter momentos mortos, por ter que estar à espera de que a mesma chegasse. Por vezes, recebíamos a informação perto da data limite, mas nada que compromete-se a entrada do produto no mercado ou até mesmo a alteração de uma AIM.

3.4.2. Durabilidade do estágio

O estágio em indústria farmacêutica é de apenas 3 meses, o que a meu ver tem uma duração reduzida, pois como o departamento de Registos está dividido em três áreas acabei por ficar 1 mês em cada, o que permitiu ficar a saber apenas o básico de cada área.

Nos primeiros dois meses despendi mais tempo a entender a dinâmica e procedimentos do GTM, mais concretamente do Departamento de Assuntos Regulamentares. A curta duração do estágio não permitiu a realização de certas tarefas, que ou eram demasiado elaboradas, exigindo um conhecimento sólido dos procedimentos regulamentares e familiarização com as comunicações internas e externas ou por simplesmente não terem sido realizadas durante o período em que lá estive. No último mês é que me senti mais à vontade e familiarizada, tanto com a rede de trabalho como com algumas funções e tarefas, o que tornou a realização destas mais rápida e eficiente. No entanto, considero que o período de estágio devia ser mais prolongado para termos a experiência completa do que um farmacêutico faz no departamento de Registos.

4. Conclusão

Este estágio curricular foi o meu primeiro contacto com a indústria farmacêutica, em que tive o prazer de perceber o seu funcionamento e os diversos departamentos incluídos dentro desta. Durante o meu estágio no GTM, percebi a enorme extensão que este grupo tem, não só em Portugal, como noutros países espalhados pelo mundo.

Reforçar ainda que tive o privilégio de conhecer pessoas que me fizeram crescer tanto a nível profissional, como também a nível pessoal e se demonstraram sempre disponíveis para ajudar no que era possível. Ao trabalhar nesta equipa, aprendi a importância da colaboração e comunicação na resolução de desafios.

Em suma, esta experiência proporcionou-me a visão do que um farmacêutico podia fazer numa indústria farmacêutica, que o seu conhecimento e competências são essenciais para as etapas do ciclo de vida dos medicamentos, como também me preparou para enfrentar adversidades que possam ocorrer no meu futuro profissional.

Bibliografia

1. TECNIMEDE – TECNIMEDE. [Acedido a 21 fevereiro 2023] Disponível na Internet:
<https://www.tecnimede.com/pt-pt>
2. European Medicines Agency - European Medicines Regulatory Network eSubmission Roadmap, version 2.2, final version. June 2019. [Acedido a 3 abril 2023]. Disponível na Internet:
<https://esubmission.ema.europa.eu/tiges/docs/eSubmission%20Roadmap%20final%20adopted%20by%20HMA.pdf>

Capítulo II

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Reis Barata - Odivelas



Orientadora: Dra. Andreia Fernandes

Lista de Abreviaturas

CEM – Contraceção de emergência

FRB – Farmácia Reis Barata

GRB – Grupo Reis Barata

MNSRM – Medicamento não sujeito a receita médica

MSRM – Medicamento sujeito a receita médica

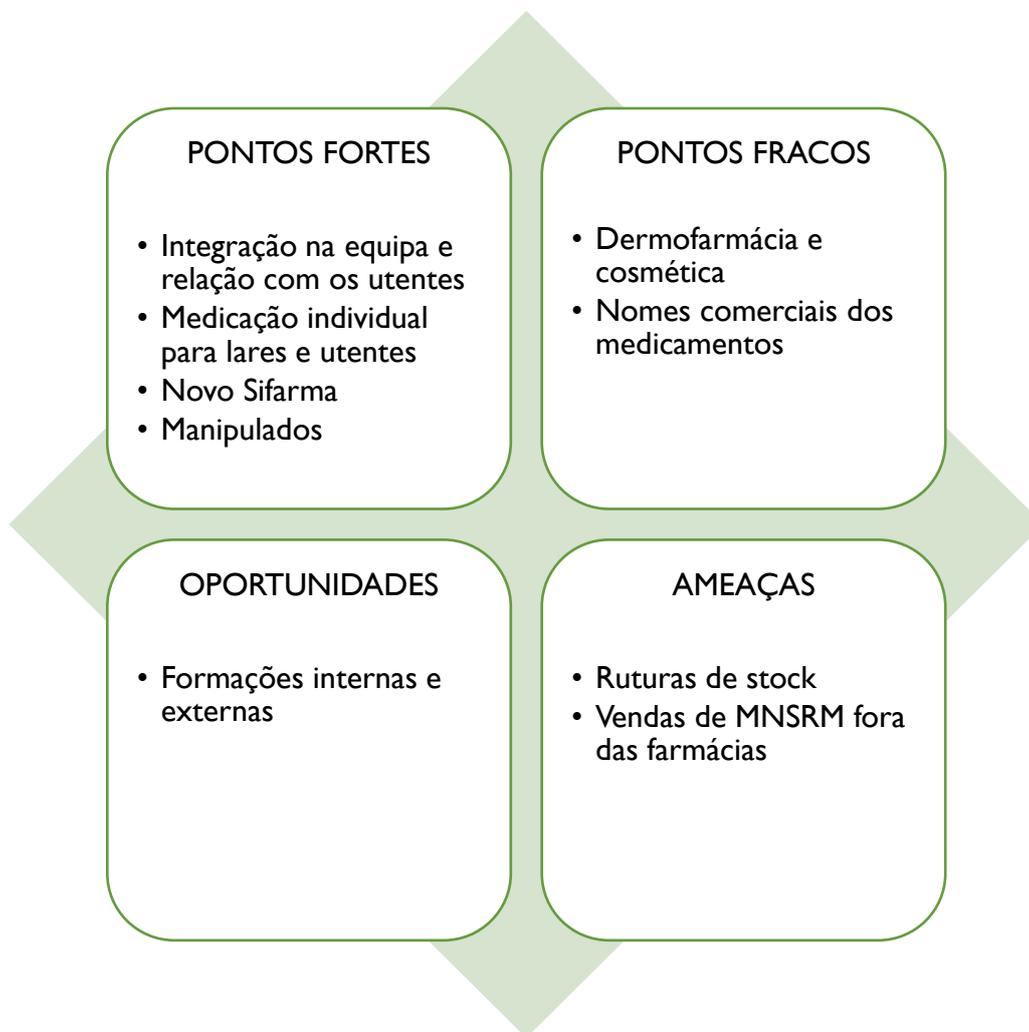
I. Introdução

No plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra está contemplado, no último ano do curso, a realização de um estágio em Farmácia Comunitária. A Farmácia Comunitária constitui o primeiro local de contacto entre os utentes e um estabelecimento de saúde, posto isto, o farmacêutico vai ser o profissional de saúde a que as pessoas vão recorrer quando necessitarem de ajuda para questões menores de saúde.

Tive a possibilidade de integrar a equipa da Farmácia Reis Barata (FRB) em Odivelas entre o período 3 de abril a 31 de julho, dirigida pela Diretora Técnica Dra. Andreia Fernandes. A farmácia onde estive a estagiar faz parte do Grupo Reis Barata, grupo este que possui 5 farmácias e 2 espaços de saúde na região de Lisboa, Almada, Amadora, Évora e Odivelas. A FRB contempla vários serviços, como avaliação de sinais, testes Covid-19, administração de injetáveis e vacinas, podologia, nutrição, perfuração de orelhas, entre outros.

Em seguida, segue-se a análise SWOT e posteriormente a exposição de casos clínicos mais relevantes que experienciei durante o meu estágio na farmácia, assim como uma análise destes.

2. Análise SWOT



2.1. Pontos fortes (Strengths)

2.1.1. Integração na equipa e relação com os utentes

A FRB está dividida em duas equipas, a equipa do balcão, que é responsável pelo atendimento e back-office e a equipa dos lares, que é responsável por todo o processo de preparação da medicação individual dos utentes e lares. Logo no primeiro dia fui apresentada às duas equipas e posteriormente, foi-me feita uma visita por todos os espaços da farmácia.

Em relação aos utentes, como a FRB trabalha com um cartão próprio, o qual fidelizava muitas pessoas, o que fazia com que confiassem bastante nos colaboradores da farmácia para qualquer problema ou dúvida que tivessem. Tal motivo deve-se não só a todos os atendimentos se realizarem com a devida competência, excelência e cordialidade como também, aos diversos serviços de saúde existentes que tornam mais prática a ida à farmácia do que a outro estabelecimento de saúde, como é o caso da administração de vacinas e injetáveis, que se torna muito mais prático e célere para o utente.

Ao fim de pouco tempo de estágio senti que me deram autonomia suficiente para a realização de atendimento ao balcão sozinho, no entanto, assim que surgisse alguma dúvida, demonstravam-se sempre prontos a ajudar.

2.1.2. Medicação individual para lares e utentes

No presente estágio tive a oportunidade de preparar a medicação individual tanto de utentes usuais da farmácia, como a de lares, e assistir aos procedimentos inerentes a esta atividade. O FRB tem uma parceria com vários lares na região de Lisboa, em que cada instituição fornece as receitas médicas inerentes a cada utente e posteriormente, prepara a medicação. A entrega é realizada semanalmente ou quinzenalmente, em que é enviado um rolo por utente, este é constituído por sacos que correspondem à altura do dia em que pessoa deve tomar a sua medicação. Como havia por vezes idosos já com dificuldades de deglutição, a medicação destes era triturada de forma a ser mais fácil a administração desta. Quando ocorriam alterações à medicação, o lar mandava as devidas alterações e posteriormente alguém na farmácia fazia a alteração no cardex do utente. Enquanto estagiária tive a oportunidade de passar por todas as etapas deste processo, desde à revisão dos cardex, à preparação e confirmação da medicação individual.

2.1.3. Novo Sifarma[®]

A farmácia RB dispõe do software Novo Sifarma[®], o que já me era familiar desde o estágio de verão anteriormente realizado noutra farmácia, que também possuía este software, que no decurso dos atendimentos ao balcão que o sistema permite aceder fácil e rapidamente a ferramentas que nos ajudam a complementar o aconselhamento, tais como, indicações de posologia, contraindicações ou qualquer outro tipo de informação que seja necessário transmitir ao utente.

Em acréscimo, cada produto na farmácia tem uma ficha, que para além das informações mencionadas anteriormente, também contem a composição, indicação terapêutica, interações, se é um MSRM, MNSRM ou suplemento alimentar, entre outros, o que foi uma mais-valia para os produtos que não conhecia antes de iniciar o estágio.

2.1.4. Manipulados

Na FRB faz-se a produção de alguns manipulados, como por exemplo, o creme de Permetrina, utilizado na sarna, xarope de Cefuroxima, que é um antibiótico alternativo aos intolerantes aos betalactâmicos e cápsulas de Minoxidil, associado ao tratamento da queda de cabelo, cuja ficha de preparação se encontra no Anexo I. Como nos dias de hoje a preparação de manipulados em farmácia caiu em desuso, tive a possibilidade de preparar alguns medicamentos mencionados anteriormente, pondo em prática o que aprendemos nas aulas de Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica. A preparação de alguns destes medicamentos devia-se ao facto da escassez ou rutura de stock dos mesmos, arrançando-se assim alternativa para as pessoas que necessitavam mesmo da medicação.

2.2. Pontos fracos (Weaknesses)

2.2.1. Dermofarmácia e cosmética

Durante o meu estágio não tive muito contacto com a área de dermofarmácia e cosmética, pois a FRB tem uma especialista em dermocosmética e como tal, a maior parte dos atendimentos eram reencaminhados para ela. Porém, nos dias em que a especialista estava ausente, pude acompanhar atendimentos em que era necessário o conhecimento dos produtos para um aconselhamento otimizado. Consequentemente, o pouco acompanhamento que fiz foi o suficiente para que houvesse um aumento nas minhas competências de modo a que me sentisse confortável quando houvesse a possibilidade de fazer um aconselhamento.

2.2.2. Nomes comerciais dos medicamentos

Durante os atendimentos das primeiras semanas de estágio que senti por vezes uma dificuldade em associar o nome de um medicamento ao seu princípio ativo, isto porque durante a faculdade só falamos em princípios ativos e muito raramente foi dado o exemplo de marcas. Com isto, os atendimentos eram por vezes mais demorados até conseguir descobrir qual era o constituinte ou talvez também pudesse transparecer que não sabia que medicamento estavam a falar quando abordavam o nome.

2.3. Oportunidades (Opportunities)

2.3.1. Formações internas e externas

O GRB é muito focado no investimento da formação e na melhoria e complemento de conhecimento dos colaboradores, como tal foi-me fornecida a oportunidade de participar nas formações internas e externas.

As formações internas eram dadas por Delegados de Informação Médica, no caso das formações que pude assistir, estes pertenciam à Nestlé®, Elancil® e Skinceutical®. No geral, foram todas de curta duração e consistiam na apresentação dos produtos de cada laboratório e em que situações poderíamos aconselhar os seus produtos.

No mês de junho, houve a possibilidade de me inscrever numa visita às instalações da Sidefarma, que é a indústria onde se produz por exemplo, o Dolocalma®, durante a visita às instalações da fábrica, tivemos o privilégio de passar por todas as etapas do ciclo do medicamento, desde a receção e armazenamento do princípio ativo, excipientes e acondicionamento primário e secundário, fabrico e por último controlo de qualidade. Posteriormente à visita, tivemos uma palestra sobre o papel do farmacêutico nas doenças de verão.

2.4. Ameaças (Threats)

2.4.1. Ruturas de stock

Durante os 4 meses em que estive na farmácia deparei-me com vários tipos de medicamentos esgotados nos armazenistas, desde MSRM a MNSRM, sem previsão de voltarem a serem comercializados. Tal situação demonstrou-se deveras frustrante para os utentes, visto que não iria satisfazer as necessidades destes, principalmente para as pessoas que fazem tratamento contínuo com os medicamentos que se encontravam esgotados. Em acréscimo, muitos dos medicamentos não tinham alternativa terapêutica, para além de terem muita dificuldade em marcar uma consulta tão prontamente de modo que pudessem ser prescritas alternativas aos medicamentos que eram de uso habitual. Os utentes ao depararem-se com tal situação, descarregaram muitas vezes as culpas no farmacêutico ou na farmácia pela falta dos medicamentos em causa, sem perceberem que este problema era alheio à farmácia.

A título de exemplo temos o Ozempic® (Semaglutido) e o Trulicity® (Dulaglutido) que são insulinas para os diabéticos tipo 2, porém têm sido muito utilizados para o tratamento

da obesidade, de tal forma que as empresas responsáveis por estes medicamentos não conseguiram dar vazão à afluência de pessoas, quer diabéticos, quer obesos.

Como exemplo de outro medicamento esgotado é o Cholib[®] que contém a associação de Fenofibrato, responsável pela redução dos triglicéridos, e Sinvastatina, responsável pela redução do colesterol. Este medicamento de uso crónico é uma das exceções em que é possível fazer uma troca, neste caso para os dois princípios ativos em separado, com as mesmas dosagens.

2.4.2. Venda de MNSRM fora das farmácias

Após o Decreto-Lei nº 134/2005 de 16 de Agosto, foi legalizada a venda de MNSRM fora das farmácias, de forma a aumentar a acessibilidade e reduzir o custo para com os utentes¹. Com isto veio a verificar-se um prejuízo financeiro para as farmácias, pois os estabelecimentos incluídos na venda de MNSRM localizam-se, a maior parte deles, nas grandes superfícies de supermercados, e vendem os medicamentos a um preço muito inferior ao praticado na farmácia. Para além da parte económica, por vezes verifica-se uma falta de aconselhamento mais informado e acompanhamento farmacoterapêutico para com um doente, que pode ter como consequência a má utilização de medicamentos.

3. Casos Clínicos

Caso I

Uma senhora com cerca de 30 anos dirigiu-se à farmácia com uma receita eletrónica que continha Urispas[®] e fosfomicina, com esta medicação chegou-se à conclusão de que a utente tinha uma infeção urinária.

Depois de ter ido buscar os medicamentos, expliquei à utente a toma destes. Primeiramente, o Urispas[®] é um antiespasmódico das vias urinárias, que contém floxavato, deve ser tomado 3 vezes ao dia e depois das refeições, pois pode ter como efeito secundário as náuseas². A embalagem de Fosfomicina Monuril[®] é de toma única, este medicamento é um antibiótico usado no tratamento da cistite em mulheres, tem que ser dissolvido em água e ingerir antes de se ir deitar e com a bexiga vazia³.

De seguida, questioneei à utente se já realizava algum tipo de lavagem íntima, ao qual me respondeu que não, então aconselhei o uso de Lactacyd[®] com Prebióticos, pois este estabelece

a microflora vaginal⁴. Recomendei também a ingestão de bastantes líquidos e o uso de roupa íntima de algodão que não apertasse muito.

Caso II

Uma senhora com cerca de 70 anos dirige-se à farmácia e pede algo para a tosse e irritação na garganta. Questionei se se tratava de uma tosse seca ou com expetoração, ao qual a resposta foi tosse seca. Aconselhei a toma de Benflux[®] Tosse Seca, que contém dextrometorfano, um antitússico de ação central, e está indicado para o tratamento sintomático da tosse de origem irritativa, em que a toma tinha de ser 15 ml com intervalo de 6-8 horas durante 5 dias⁵.

Em relação à irritação na garganta, perguntei se era só mesmo irritação ou se já sentia uma ligeira dor de garganta, ao qual a senhora afirma que se trata apenas de irritação na garganta. Como tal, sugeri umas pastilhas que contém apenas antisséptico, Strepsils[®] e uma vez que a utente era diabética, aconselhei Strepsils[®] de Limão sem Açúcar⁶. Alertei que ingestão das pastilhas deve ser feito com intervalos de 2 a 3 horas, mas no máximo só 12 pastilhas por dia.

Caso III

Um utente do sexo masculino, com cerca de 20 anos, desloca-se à farmácia com queixas de diarreia, questionei há quantos dias se encontrava assim, se as dejeções eram recorrentes e continham sangue, se tinha febre associada e sensação de barriga inchada ou com gases, ao qual ele me responde que já estava assim há mais de um dia, não tinha sinais de sangue nas fezes nem febre, mas que sentia a barriga inchada.

Para proporcionar uma solução para o problema do utente, aconselhei a toma de Imodium Plus[®], usado no tratamento sintomático de diarreia aguda associada a desconforto abdominal, que contém loperamida, um agente obstipante, e o simeticone, que alivia a sensação de barriga inchada e gases causadas pela diarreia⁷. Expliquei que a toma devia ser inicialmente de 2 comprimidos, seguidos de 1 comprimido após cada dejeção, porém não podia exceder a dose máxima de 4 comprimidos por dia, nem prolongar o tratamento por mais de 2 dias. Em acréscimo, alertei para o facto de o utente estar a perder líquidos e eletrólitos e ser importante a sua reposição, como tal, aconselhei a sua rehidratação com a toma de Dioralyte[®] que tem na sua composição as seguintes substâncias ativas: glicose, cloreto de sódio, cloreto

de potássio e citrato dissódico. Expliquei que a toma devia ser uma saqueta dissolvida em água após cada dejeção diarreica, com o objetivo de repor o equilíbrio hidro-eletrolítico⁸.

Por fim, ressalvei que caso aparecesse sangue nas fezes, febre ou que os sintomas persistissem por mais de 2 dias, que o utente deveria dirigir-se ao médico para despistar possíveis outras causas.

Caso IV

Uma utente do sexo feminino dirigiu-se à farmácia e pediu a “pílula do dia seguinte”. Primeiramente, questionei se era para a própria, há quantas horas tinha sido a relação sexual, e se há mais ou menos que 72 horas, ao qual me respondeu que era para a própria e que a relação tinha sido há 24 horas.

Na tentativa de perceber qual a contraceção de emergência (CEM) mais adequada, realizei algumas perguntas tais como, se era asmática, se tomava alguma contraceção oral. Afirma que não era asmática e que tomava a “pílula”. Posto isto, aconselhei Postinor[®], que é de toma única. O Postinor[®] tem como princípio ativo o levonorgestrel, é uma progesterona que impede a ovulação e fertilização⁹.

Antes da utente se ir embora, adverti para o facto de que se tivesse vómitos ou diarreia nas 3 horas subsequentes à toma, deveria repetir a toma do medicamento, de modo a garantir a eficácia da CEM. Também alertei que devia usar um método contracetivo barreira até à próxima menstruação, assim como, continuar a tomar o seu método contracetivo oral normalmente, podendo, no entanto, haver possíveis alterações no seu ciclo menstrual.

Caso V

Um utente deslocou-se à farmácia à procura de aconselhamento, afirmando que o seu filho com 5 meses tinha o “rabinho” assado, mostrou-nos uma foto em que se notava a assadura assim como pintas avermelhadas.

Após pedir a opinião à farmacêutica, decidimos aconselhar ISDIN Nutraisdin AF[®], que é uma pomada reparadora e antifúngica, pois contêm miconazol que limita a proliferação dos microrganismos¹⁰. Advertimos para o uso da pomada no máximo de 7 dias e que devia ser aplicada a cada muda de fralda, na zona afetada após a pele ser limpa e seca. Recomendámos o uso de toalhetes sem perfume, pois as fragrâncias podem irritar mais a pele do bebé.

4. Conclusão

Durante o meu estágio passei por algumas adversidades que, no fim, culminaram num crescer tanto pessoal, como uma profissional de saúde competente e responsável. Os meses que passei na farmácia a acompanhar profissionais de excelência, ajudaram-me a perceber como é que o farmacêutico consegue intervir em diversas situações e serviços disponibilizados pela farmácia.

Em acréscimo, os serviços prestados pela FRB são um exemplo de dinamismo e auxílio às pessoas da sociedade. A intervenção dos profissionais de saúde da farmácia nestes serviços é sempre feita de forma responsável e com uma preparação prévia para que seja realizado um atendimento de excelência.

Posto isto, considero que o estágio curricular em Farmácia Comunitária é essencial para o nosso futuro profissional farmacêutico, pois tanto tive a oportunidade de aperfeiçoar e expandir os conhecimentos adquiridos ao longo dos 5 anos do curso, como também, de experienciar o papel do farmacêutico na farmácia comunitária.

Bibliografia

1. Decreto-Lei n° 134/2005 de 16 de agosto de 2005 do Ministério da Saúde, Diário da República, 1ª Série, n° 156 de 16 de agosto de 2005.
2. INFARMED, I.P. - Resumo das Características do Medicamento Urispás® [Acedido a 12 abril de 2023]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
3. INFARMED, I.P. - Resumo das Características do Medicamento Fosfomicina Monuril® [Acedido a 12 abril de 2023]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
4. INFARMED, I.P. - Resumo das Características do Medicamento Lactacyd® com Prebióticos [Acedido a 28 abril de 2023]. Disponível na Internet: https://www.lactacyd.pt/product/lactacydr-pharma-com-prebioticos?gclid=CjwKCAjwo9unBhBTEiwAipCIlxg7Q7mhET69CRGx8S2K_RED b5o7km4nLyQdDGUzIfEDIjKXOK-URoCZekQAvD_BwE&gclid=aw.ds
5. INFARMED, I.P. - Resumo das Características do Medicamento Benflux® Tosse Seca [Acedido a 5 maio de 2023]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
6. INFARMED, I.P. - Resumo das Características do Medicamento Strepsils® Limão sem açúcar [Acedido a 5 maio de 2023]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
7. INFARMED, I.P. - Resumo das Características do Medicamento Imodium® plus [Acedido a 31 maio de 2023]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
8. INFARMED, I.P. - Resumo das Características do Medicamento Diolaryte® [Acedido a 2 junho de 2023]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
9. INFARMED, I.P. - Resumo das Características do Medicamento Postinor® [Acedido a 13 junho de 2023]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
10. INFARMED, I.P. - Resumo das Características do Medicamento ISDIN® Nutraisdin AF [Acedido a 23 junho de 2023]. Disponível na Internet: <https://www.isdin.com/pt-PT/produto/baby-naturals-nutraisdin/AF-pomada-reparadora>

Anexo I



Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados

Medicamento: Cápsulas minoxidil 0,5mg

Teor em substância(s) activa(s): Cada cápsula contém 0,5mg de minoxidil

Forma farmacêutica: Cápsulas

Data de preparação:

Número do lote:

Quantidade total a preparar: 180 cápsulas

180 cápsulas

Matérias Primas	Nº Lote / Validade	Origem	Farmacopeia	Quantidade para 100g (ou ml, ou unidades)	Quantidade calculada	Quantidade Pesada	Rubrica do operador e data	Rubrica do supervisor e data
Minoxidil	218565	Fogson	Ph. Eur.	0,0995g	0,9995g	0,9995g		
Excipiente nº1	22724 225 100574	Fogson	Ph. Eur.	30,96g	30,96g	30,10g		
Cápsulas nº2	231353 CB A	Aciphar	Ph. Eur.	90+70 +19	90+90 +19	90+50 +15	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>

Preparação

Rubrica do Operador

1. Garantiu-se a reunião das condições necessárias à manipulação;	
2. Pesou-se a quantidade de Minoxidil para um copo de vidro;	
3. Calculou-se a quantidade de excipiente a utilizar pela densidade do minoxidil pó e misturou-se com o minoxidil, por diluição geométrica;	
4. Misturou-se até homogeneização;	
5. Encapsulou-se;	
6. Acondicionou-se e rotulou-se;	

Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados

Embalagem

Tipo de embalagem: Frasco de Vidro Conta Gotas 100 mL

Capacidade do recipiente:

Material de embalagem	Nº do lote	Origem
Frasco de plástico 100 mL		Fey Wn

Operador: [assinatura]

Prazo de utilização e Condições de conservação

Condições de conservação:

Temperatura ambiente

Operador: [assinatura]

Prazo de utilização:

6 meses

Operador: [assinatura]

Verificação

Ensaio	Especificações	Resultado	Rubrica do operador
Cor Odor Aspeto	Esbranquiçado Odor Característico Homogéneo	cofuro	[assinatura]
Conformidade com monografia de f.f. líquidas de uso tópico	Farmacopeia Portuguesa	cofuro	[assinatura]
Uniformidade de massa	MCR: 0,17g MCA: 0,14g	cofuro	[assinatura]
		Aprovado ✓	Rejeitado

Supervisor: [assinatura] Data: 27.06.2023

Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados

Nome, morada e telefone do doente

Nome do prescritor

Anotações

Cálculo do Preço de Venda:

Matérias-primas	Embalagem existente em armazém		preço de aquisição de uma dada quantidade unitária (s/IVA)		Quantidade a usar	Factor multiplicativo	Valor da matéria-prima utilizada na preparação
	Quantidade adquirida	Preço de aquisição (s/IVA)	Quantidade unitária	Preço			
Minoxidil	100	56,10	1 g	0,56 €	0,1	2,5	0,14 €
Excipiente	500	32,49	1	0,06 €	36,92	1,9	4,56 €
Cápsulas	1000	17,27	1	0,02 €	180	1,6	4,97 €
Sub total A							9,67223 €

Honorários de Manipulação

	Forma Farmacéutica	Quantidade	F (R)	Factor Multiplicativo	Total
Valor referente à quant. base	capsulas	100	5,11	4,5	23,00 €
Valor adicional		80	0,01	4,5	3,60 €
Subtotal B					26,60 €

Material de Embalagem

Material de Embalagem	Preço de aquisição (s/IVA)	Quantidade	Factor Multiplicativo	Total
Frasco de vidro	0,62 €	3	1,2	2,23 €
Subtotal C				2,2320 €

Preço de Venda ao Público do Medicamento Manipulado:

(A+B+C) x	50,0490 €
+ IVA 6%	3,00294 €
D (Preço Final)	53,0519 €

 Farmácia Reis Barata Odivelas D.T.: Dra. Andreia Fernandes Rua Heróis de Chalmite nº5A Odivelas Tel.: 219570046	Médico: Rui Oliveira Soares Doente: XXXXXXXXXX
	Nº de receita: XXXXXXXXXX
Cápsulas de Minoxidil 0,5 mg	
1 cápsula contém 0,5mg de minoxidil Contém celulose microcristalina Qtdd. dispensada: 180 cápsulas	Data Preparação: 26-06-2023 Validade: 6 meses Conservar à temperatura ambiente no frasco bem fechado Limitar o contacto do medicamento com o ar. Lote: XXXXXXXXXX Manter fecho

Capítulo III

Vacinas de mRNA para a imunoterapia do cancro



Professor Doutor João Nuno Sereno de Almeida Moreira

Resumo

O cancro é uma das principais causas de morte a nível mundial, todos os anos vitimiza milhões de pessoas. Por este motivo, é urgente inovar na área da imunoterapia contra o cancro. Assim, existem as vacinas de mRNA como uma tecnologia promissora como estratégia terapêutica.

A pesquisa para a imunoterapia do cancro tem vindo a ter progressos ao longo dos anos, tornando-se evidente pelos ensaios clínicos que são realizados assim como os resultados obtidos. A recente pandemia provocada pelo SARS-CoV-2 veio impulsionar a investigação e aperfeiçoamento da tecnologia da vacinação com mRNA na imunoterapia do cancro.

Na presente monografia, vai ser exposto o objetivo principal na formulação deste tipo de vacina é garantir expressamos o antigénio de interesse de modo a desencadear uma resposta pelo sistema imune a combater as células cancerígenas. Desta forma, temos que evitar que o mRNA se degrade até que seja traduzido na proteína de interesse. Para tal, necessitamos de um veículo de entrega que seja capaz de ultrapassar as barreiras biológicas e proteger as moléculas de mRNA contra a degradação pelas nucleases.

Vamos também observar algumas das limitações desta terapêutica, assim como os ensaios clínicos que estão a decorrer e as principais empresas responsáveis pela investigação nesta área.

Palavras-chave: Vacina de mRNA, Imunoterapia, Sistemas de entregas, Cancro

Abstract

Cancer is one of the main causes of death worldwide, killing millions of people every year. For this reason, there is an urgent need to innovate in the area of cancer immunotherapy. At the moment, mRNA vaccines exist as a promising technology as a therapeutic strategy.

Research on cancer immunotherapy has been making progress over the years, becoming evident in the clinical trials carried out as well as the results obtained. The recent pandemic caused by SARS-CoV-2 has boosted research and improvement of mRNA vaccination technology in cancer immunotherapy.

In this monograph, it will be explained the main objective in formulating this type of vaccine, which is to ensure expression of the antigen of interest in order to trigger a response by the immune system to combat cancer cells. In this way, of mRNA degradation is requested in order to successfully translate the protein of interest. To achieve this, we need a delivery vehicle that is capable of overcoming biological barriers and protecting mRNA molecules against degradation by nucleases.

We will also look at some of the limitations of this therapy, as well as the clinical trials that are taking place and the main companies responsible for research in this area.

Keywords: mRNA vaccine, immunotherapy, delivery systems, cancer

Lista de Abreviaturas

AAT – Antígenos associados a tumores

AET – Antígenos específicos de tumores

AT – Antígenos tumorais

DC – Célula Dendrítica

IC – *Immune Checkpoint*

ICI – Inibidores *Immune Checkpoint*

LPHNs – Nanopartículas Híbridas

NPL – Nanopartícula Lipídica

MHC – Complexo Major de Histocompatibilidade

NLS – Sinal de localização nuclear

VAN – Vacinas de ácidos nucleicos

TCR – recetor das células T

TLR – Recetor *toll-like*

T regs – Linfócitos T reguladores

I. Introdução

Atualmente, o cancro é um dos maiores problemas de saúde no mundo, com uma incidência altíssima, provocando a morte a milhões de pessoas, todos os anos. Segundo a OMS, no ano de 2020 registou-se o aparecimento de 19 milhões de novos casos e foram registadas quase 10 milhões de mortes. Prevê-se que nas próximas décadas a incidência de novos casos venha a aumentar. Como tal, devido ao número exorbitante de casos, é urgente encontrar novas terapias contra o cancro¹. Os tumores sólidos podem localizar-se em qualquer órgão do corpo ou tecido e caracterizam-se pelo crescimento descontrolado e acelerado das células anormais no corpo, resultando na formação de uma massa tumoral, denominada por neoplasia, que tanto pode ser benigna ou maligna. As células modificadas conseguem invadir tecidos e disseminar-se para outras partes do corpo através da corrente sanguínea ou sistema linfático, formando metástases. O cancro é uma doença genética, ou seja, ocorrem erros nos genes que se traduzem na produção de proteínas anormais alterando o normal funcionamento da célula².

Frequentemente, a primeira linha de tratamento para o cancro consiste em cirurgia, quimioterapia ou terapia com radiação. A escolha do tratamento ideal depende do tipo e estadio do cancro, mas também da saúde do doente. Com o passar do tempo, observou-se que os tratamentos de primeira linha tinham limitação na sua eficácia, sobretudo se o tumor estivesse num estadio mais avançado.

A imunoterapia consiste na estratégia de tratamento que visa modular ou ativar o sistema imunitário do doente a destruir as células cancerígenas. As abordagens atuais de imunoterapia envolvem estratégias como é o caso das vacinas, que estimulam o sistema imunitário a gerar uma resposta contra o cancro; como os anticorpos; vetores virais e inibidores *immune checkpoints* (ICI), por exemplo anti-PD-1, anti-PD-L1 e anti CTLA-4³.

Uma abordagem promissora que nos últimos anos foi potenciada pela pandemia do SARS-CoV-2 foram as vacinas de mRNA, que com o desenvolvimento da tecnologia das vacinas contra a COVID-19, permitiu o aperfeiçoamento das plataformas de vacinação. O sucesso desta tecnologia de vacinação leva-nos a crer que terá um potencial terapêutico na imunoterapia. A FDA já tem algumas vacinas aprovadas para o tratamento do cancro, tais como Provenge (Sipuleucel-T) para o tratamento do cancro da próstata avançado, em que a vacina é direcionada para a PSA⁴, que foi aprovada em 2010, e Imlytic (Talimogene laherparepvec) para o tratamento do melanoma, aprovado em 2015⁴.

Ao longo desta monografia, basear-me-ei nas vantagens da utilização do mRNA, nos diversos veículos de entrega existentes para as vacinas de mRNA, tecnologias atuais que estão a ser desenvolvidas e as empresas envolvidas assim como as limitações à utilização destas vacinas.

2. Diferentes vacinas para o cancro

Existem quatro tipos de vacinas para o cancro: vacinas à base de células, vacinas de vetores virais, vacinas peptídicas e vacinas de ácidos nucleicos (VAN)⁵. As vacinas à base de células são preparadas a partir de células inteiras ou fragmentos destas que induzem uma resposta imune mais ampla. As vacinas peptídicas incluem preparações químicas e biossintéticas de antígenos tumorais específicos conhecidos ou previstos, que induzem uma resposta imune robusta contra o local específico do tumor. As VAN, que tanto podem ser constituídas por DNA como mRNA, conseguem fazer a entrega de variados antígenos de modo a desencadear imunidade celular e humoral. A preparação desta vacina é mais simples e rápida⁶. Como anteriormente referido, irei aprofundar mais o tema das vacinas para o cancro, nomeadamente vacinas de mRNA.

As moléculas de mRNA, que são de expressão transitória, logo não ocorre expressão permanente das proteínas, surgem como uma alternativa aos plasmídeos de DNA, uma vez que apresentam um perfil de segurança maior porque não integram o genoma das células, e como tal, evitam a ocorrência de possíveis mutações³. Em acréscimo, em relação ao custo e eficácia da produção, as vacinas de mRNA demonstraram ser mais vantajosas quando comparadas com as vacinas de DNA. O processo de produção das vacinas de mRNA é mais célere, barato e com maior simplicidade, para além de terem maior precisão para a genómica do tumor⁷. O risco de ocorrer contaminação por microrganismos vai ser superior nas vacinas de DNA, pois a produção desta vacina está dependente de células para realizar as etapas de construção, desde a fermentação bacteriana à purificação. Por estes motivos, tem-se vindo a estudar a sua eficácia na imunoterapia contra o cancro, pois evita algumas limitações inerentes aos plasmídeos de DNA. (**Tabela I**)

Tabela I - Comparação entre vacinas de DNA e vacinas de mRNA.

Vacinas de DNA	Vacinas de mRNA	Referências
Produção está dependente de células – fermentação bacteriana para a amplificação do plasmídeo recombinante, isolamento e purificação	Produção não está dependente de células - moléculas lineares de DNA ou bibliotecas de cDNA são usadas como molde	8,9
Sequências procariotas e eucariotas	Sequências eucariotas	8
Incluem um sinal de localização nuclear (NLS) que permite o transporte do DNA para dentro do núcleo	Não necessitam do NLS	10
Potencial risco oncogénico	Não há risco de ocorrer mutações	8
↑t _{1/2} e estabilidade	↓t _{1/2} e estabilidade	11
Via de administração mais favorável: intramuscular	Via de administração mais favorável: intradérmica e intranodal	12,7
Processo de produção mais dispendioso, moroso e complexo	Processo de produção mais barato, rápido, simples e viável	8,9
Ambos necessitam da otimização dos seus codões		
O design do promotor é importante	Inclusão de nucleótidos modificados na sua estrutura	10
Maior probabilidade de contaminação por microrganismos	Menor risco de contaminação de microrganismos	8
Pouca natureza pró-inflamatória –menor probabilidade de desencadear respostas autoimunes	Maior natureza pró-inflamatória – propriedade self-adjuvant – probabilidade de desencadear inflamação sistémica e respostas autoimunes	8

3. mRNA

Existem dois tipos de mRNA, o mRNA não replicativo e o *self-amplifying* mRNA. No entanto, irei abordar apenas o mRNA não replicativo, em que cada molécula de mRNA dá origem a uma só proteína.

As moléculas usadas nas vacinas são constituídas pela parte 3' e 5' UTR, região não codificante; pela parte ORF, parte codificante que vai dar origem à proteína que pretendemos; 5' cap e pela cauda poliadenosina (poli (A))¹³. (Figura 1)



Figura 1 – Estrutura do mRNA. A molécula do mRNA começa com o 5' cap, seguido de 5' e 3' na extremidade da ORF e por último uma cauda poli (A) – Adaptado de Gote et al. 2023

Cada molécula de mRNA começa com a 5'cap (m7GpppN) que contém a 7-metilguanósina (m7G) e uma ligação trifosfato com o primeiro nucleótido, estas partes em conjunto dão origem a uma estrutura que tem como funções: proteger o mRNA de clivagens por parte das exonucleases, regular o splicing do pré-mRNA, assim como ser a parte que inicia a tradução da molécula e posteriormente a sua exportação para o citoplasma. O 5' cap também é importante para o sistema imune inato distinguir o mRNA exógeno do mRNA endógeno¹⁴.

As regiões não codificantes, tanto a 3' UTR como a 5' UTR, encontram-se nas extremidades da ORF, estas regiões contêm sequências regulatórias que são responsáveis pela estabilidade e tradução correta e eficiente do mRNA., assim como de auxiliarem os ribossomas a reconhecer as sequências de mRNA¹⁵.

A incorporação da cauda poli (A) é necessária para prolongar o tempo de semi-vida da vacina de mRNA, ou seja, garantir a estabilidade e a proteção da molécula de mRNA¹³.

3.1. Otimização do mRNA

Os elementos que constituem a molécula de mRNA podem ser modificados de modo a aumentar a estabilidade, tornar a tradução eficiente e aumentar as propriedades imunoestimuladoras.

Uma forma de otimizar a região codificante é enriquecer esta região com sequências guanina-citosina, ou incorporar no mRNA nucleótidos modificados, sendo que as modificações mais comuns são a 5-metilcitosina (m5C), N¹-metilpseudouridina e pseudouridina (ψ)¹⁶. O principal motivo para a inserção destes nucleótidos modificados é para escapar ao reconhecimento da molécula de mRNA pelo sistema imune inato, evitando uma resposta imune indesejada e aumentando a expressão do antígeno. Num estudo de Andries et al., o autor demonstrou que a utilização da m5C e N¹-metilpseudouridina reduziu a imunogenicidade inata intracelular, ou seja, ocorreu uma ativação controlada do recetor 3 *toll-like* (TLR3)^{13,17}.

Por último, a cauda poli (A) também pode ser otimizada de modo a potencializar a expressão da proteína de interesse. Ao aumentar a extensão da cauda, aumentamos a eficácia da tradução, ou seja, o ideal era ter uma cauda com 120 a 150 aminoácidos, e, conseqüentemente, ao retardar o tempo de degradação mantém-se a molécula estável por mais tempo^{18,19,20}.

4. Mecanismos das vacinas de mRNA para o cancro

4.1. Resposta imune adaptativa

A resposta imune adaptativa pode ser desencadeada pelos antígenos endógenos e pelos antígenos exógenos. Após a vacinação, as moléculas de mRNA entram no citoplasma das células alvo por endocitose, já no citoplasma ocorre a tradução pelos ribossomas do mRNA em proteínas, ou seja, antígenos. Posteriormente, estes antígenos podem seguir dois caminhos, caso não se trate de uma célula apresentadora de antígeno (APC) (Figura 2):

- I- Os antígenos são catabolizados pelas enzimas existentes no proteossoma, dando origem a fragmentos peptídicos antigénicos, denominados epítomos. Os epítomos ligam-se ao complexo major de histocompatibilidade I (MHC I) dentro do retículo endoplasmático e posteriormente são transportados pelo complexo de Golgi até à superfície da célula. Por fim, a molécula MHC I-epítomo vai ligar-se ao recetor da célula

T (TCR), ativando as células T CD8+, que são as células responsáveis por atacar e matar as células tumorais.

- Os antígenos são depois secretados, passando a denominar-se antígeno exógeno. Este antígeno exógeno entra na APC numa vesícula endocítica, sendo posteriormente degradado pelos lisossomas em epítomos, que depois vão ser apresentados ao MHC II. De seguida, a molécula MHC II-epítoto reconhece as células T CD4+, que simultaneamente ativa a resposta imune celular, pela secreção de citocinas e a resposta imune humoral, pela ativação das células B, responsáveis pela produção de anticorpos^{21,22}. Este antígeno exógeno também promove a ativação dos recetores *toll-like* (TLR) que vai desencadear uma resposta mediada pelo interferão (INF) tipo I²³.

As APC são as únicas células capazes de apresentar os epítotos às moléculas MHC I e MHC II, enquanto as células nucleadas, que não sejam APC, só podem apresentar os epítotos à molécula MHC I²⁴.

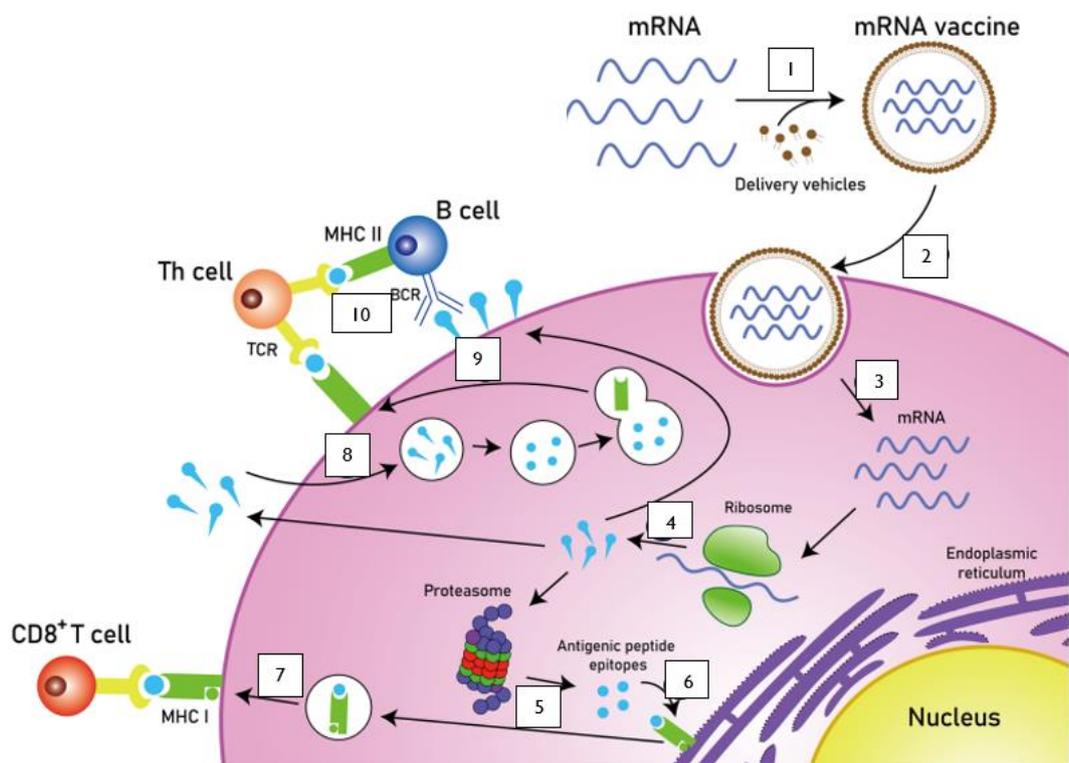


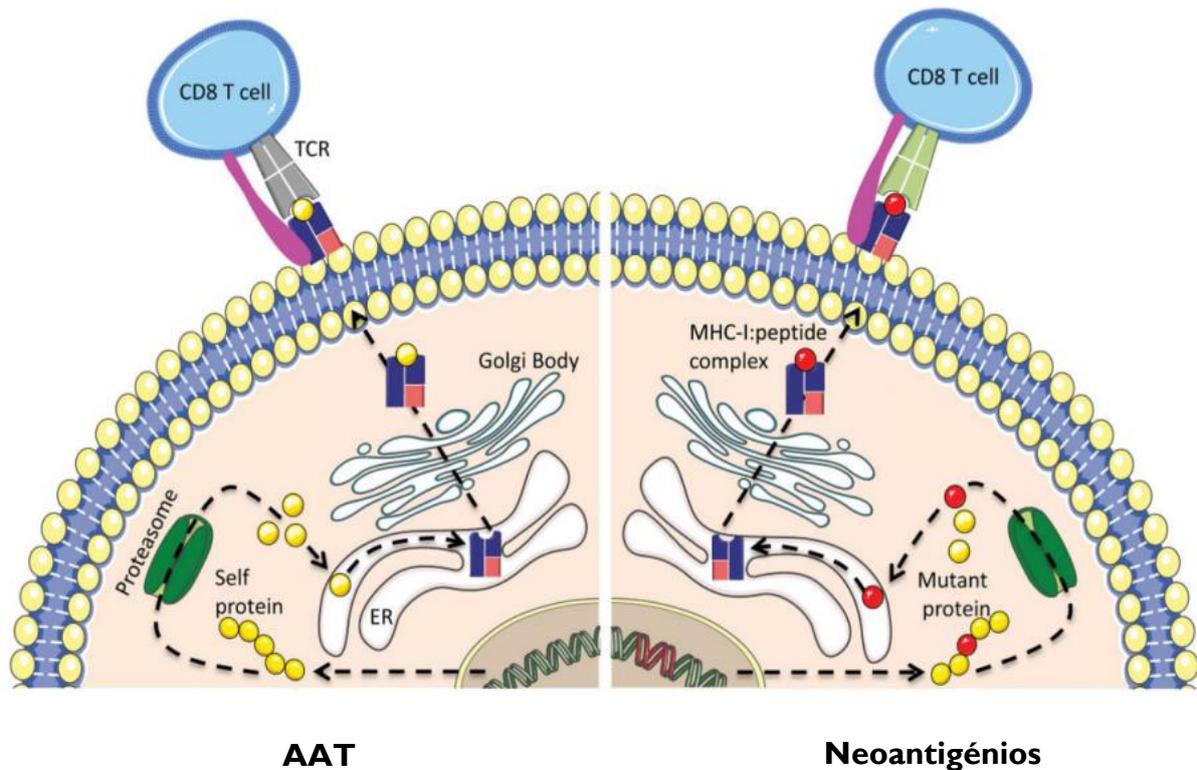
Figura 2 – Mecanismo de ação das vacinas de mRNA. 1- O mRNA é encapsulado no veículo de entrega. 2- A vacina de mRNA é internalizada por endocitose. 3- O mRNA é libertado no citoplasma. 4- O mRNA é traduzido em proteína pelo ribossoma. 5- A proteína é degradada em epítotos peptídicos antigénicos pelo proteossoma. 6- O epítoto complexa com a MHC I no retículo endoplasmático. 7- A molécula MHC I apresenta o péptido antigénico às células T CD8. 8- Alternativamente, a proteína é secretada e depois internalizada na célula, ocorrendo o processo de degradação no endossoma. 9- Os fragmentos antigénicos são apresentados pela molécula MHC II à superfície das APC às células T CD4. 10- As células T CD4 estimulam as células B a produzirem anticorpos neutralizantes contra os patógenos circulantes. Adaptado de Mei *et al.*, 2023

4.2. Antígenos tumorais

A seleção do tipo de antígeno é extremamente importante para a eficácia das vacinas para o cancro, porque são estes que vão desencadear a resposta pretendida contra as células alvo. O antígeno ideal tem de ter características específicas, tais como, ser altamente imunogénico, estritamente expresso em células cancerígenas e que seja fundamental para a sobrevivência destas. As vacinas antitumorais têm como objetivo induzir uma resposta imune contra os antígenos derivados do tumor ou antígenos tumorais (AT). Os AT estão presentes tanto no início, como na progressão e metastização do tumor. Existem dois tipos de antígenos tumorais: os antígenos associados a tumores (AAT) e os antígenos específicos de tumores (AET). (Figura 3)

Os AAT podem ser aplicados a diferentes doentes, isto porque não são específicos de um determinado tumor. Os AAT para além de serem expressos nas células malignas, também se encontram nas células saudáveis, e, como tal, aumenta o risco da vacina induzir toxicidade autoimune. Para além disso, as células tumorais tentam arranjar mecanismos para fugir à resposta imune antitumoral, como é o caso da diminuição de expressão dos AAT²⁵.

Os AET, também conhecidos como neoantígenos, em comparação com os AAT só são expressos nas células tumorais. Os neoantígenos são gerados através de mutações únicas que ocorreram nas células tumorais. Este tipo de antígeno possui uma elevada especificidade tumoral, como tal a sua imunogenicidade não é afetada por mecanismos de tolerância central²⁶.



- | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> • Expresso em múltiplos tumores • Alto risco de auto tolerância • Alto risco de resposta autoimune | <ul style="list-style-type: none"> • Único de cada tumor • Baixo risco de auto tolerância • Baixo risco de resposta autoimune |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Figura 3 - AET ou neoantígenos vs AAT. Adaptado de Zhang *et al.*, 2017

Em suma, os AAT são o tipo de antígenos mais estudados, porém os neoantígenos são os que demonstram maior eficácia nos ensaios clínicos, mas também requerem uma identificação laboratorial do tumor específico de cada doente, o que se torna dispendioso²⁷.

5. Sistemas de entrega para as vacinas de mRNA

O maior desafio das vacinas de mRNA é a eficiência da entrega do mRNA às células alvo, esta molécula tem de ser capaz de passar a membrana celular sem que haja degradação e ativação do sistema imunitário. As moléculas de mRNA livre, devido à sua carga negativa e elevado peso molecular, não conseguem penetrar facilmente a bicamada fosfolipídica que constitui a membrana celular. O sistema de entrega ideal tem de ser capaz de ultrapassar a membrana celular sem que haja degradação do mRNA pelas RNases, de modo a chegar ao

citoplasma, e, conseqüentemente ocorrer a libertação efetiva dos ácidos nucleicos dos endossomas, para posterior tradução na proteína de interesse^{20; 28}. O sucesso do sistema de entrega é essencial para que as vacinas de mRNA tenham um resultado favorável na terapêutica pretendida.

Existem atualmente duas estratégias principais para a entrega da molécula de mRNA: a entrega do mRNA com ou sem veículo de transporte e a administração de mRNA em células dendríticas (DC) *ex-vivo*.

5.1. mRNA livre

Como dito anteriormente, é difícil transferir o mRNA para dentro das culturas de células *in vivo* por este ter uma carga negativa e um tamanho grande. Por norma o mRNA livre é entregue por via intradérmica ou intranodal²⁹. Pela via intranodal, os antígenos resultantes do mRNA, são apresentadas às APC no local de ativação das células T, o que é um ponto benéfico visto que vai evitar a migração do antígeno até às APC. Há estudos que demonstram que as DC através da injeção intranodal conseguem internalizar o mRNA livre e induzir uma potente resposta anti-tumoral das células T.

A limitação da entrega do mRNA livre reside no tempo de semi-vida extracelular reduzido devido à rápida degradação pelas RNases. Para ultrapassar estas limitações, foram desenvolvidos veículos sintéticos para protegerem o mRNA de sofrer degradação, melhorar a internalização celular e melhorar a entrega da vacina, tais como lipossomas e lipoplexos, polímeros catiónicos, como as nanopartículas lipídicas (NPL)¹⁶.

5.2. Eletroporação para a administração de mRNA em células dendríticas *ex-vivo*

As DC são as APC mais eficientes, isto porque para além de terem a capacidade de internalizar e processar antígenos, que conseqüentemente vão ser apresentados aos linfócitos T CD8+ e CD4+ através das moléculas do MHC I e MHC II, respetivamente. As DC também são capazes de apresentar os antígenos aos linfócitos B, ou seja, conseguem induzir uma resposta imune adaptativa e uma resposta humoral¹².

A eletroporação é uma das técnicas que permite a transfeção do mRNA nas DC. Esta técnica consiste num impulso elétrico de alta voltagem nas DC que vai criar poros na membrana celular, permitindo a entrada das moléculas de mRNA no citoplasma das células³⁰.

A vantagem deste sistema de entrega é o facto de não haver necessidade de um veículo de transporte para o mRNA, para que haja uma transfecção eficiente. Por último, as DC autólogas transfectadas *ex-vivo* são reintroduzidas no doente, com o intuito de gerar uma resposta imune eficaz, justificando o seu uso em ensaios clínicos na imunoterapia do cancro¹². No entanto, trata-se de um método caro e que requer muito trabalho³¹. (Figura 4)

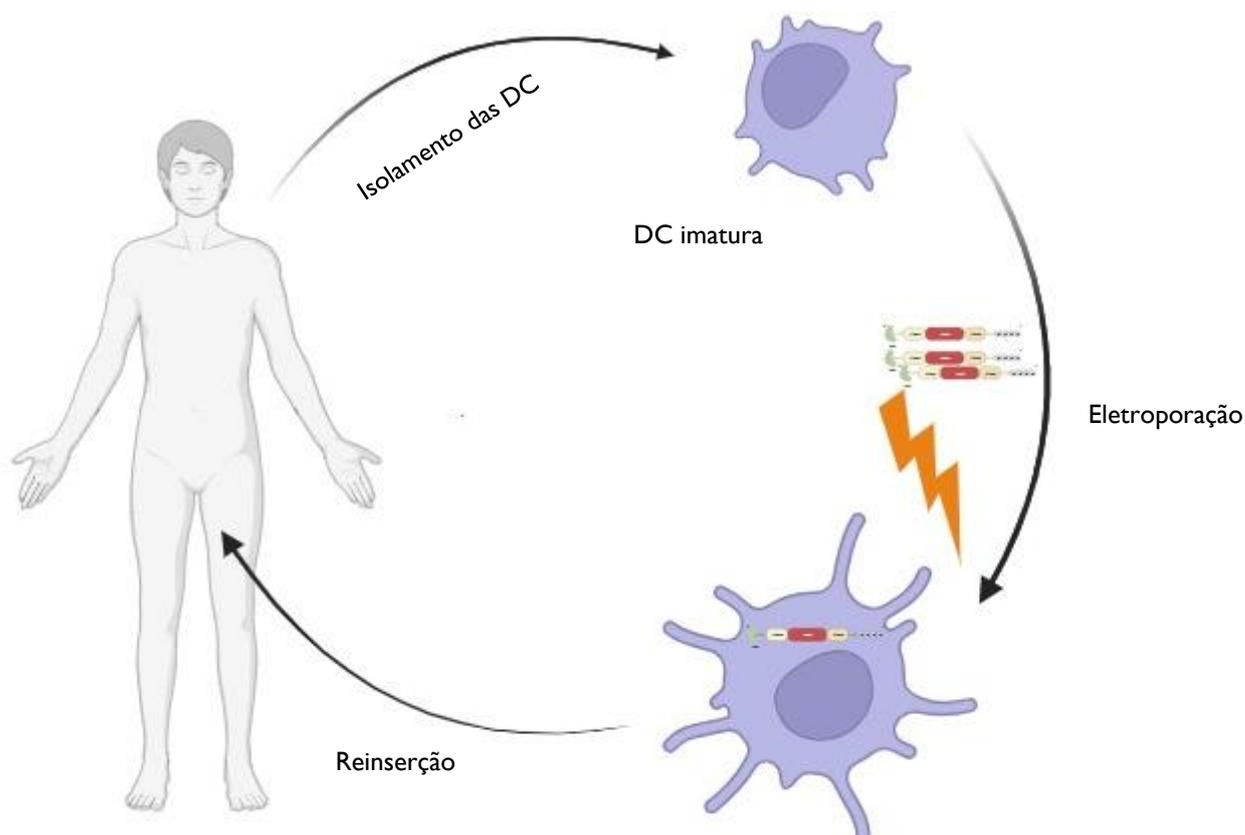


Figura 4 - Incorporação do mRNA nas DC ex-vivo. As DC são extraídas do sangue periférico do doente, posteriormente, as DC imaturas são isoladas e colocada com fatores de maturação, para depois ser entregue o mRNA por eletroporação. Por fim, as DC com mRNA vão ser reinseridas no corpo do doente pela via intravenosa. Adaptado de Jiang *et al.* 2023

5.3. Protamina

A protamina é um péptido catiónico, visto que é constituído por arginina, ou seja, é este aminoácido que lhe confere carga positiva. A protamina, conjuntamente com o mRNA, que como mencionado anteriormente tem carga negativa, formam nanopartículas condensadas que protegem as moléculas de mRNA da degradação feita pelas nucleases^{32,33}. (Figura 5)

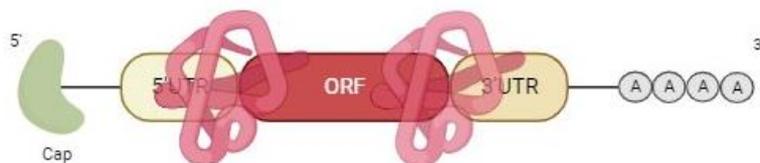


Figura 5 – Complexo protamina-mRNA. Adaptado de Nikita et al. 2022

Um exemplo desta tecnologia é a RNAActive[®], desenvolvida pela indústria CureVac. Esta tecnologia resulta na combinação dois componentes que juntos complementam as suas funções, estes são: o mRNA livre, que serve como modelo de tradução responsável pela expressão do antigénio que se quer codificar; e o complexo mRNA-protamina, que aumenta a capacidade imunoestimulatória da vacina, ou seja, ativa o TLR7/8, que conseqüentemente provoca uma resposta imune Th-1^{5,25}.

5.4. Lipossomas e Nanopartículas lipídicas

O lipossoma é constituído por bicamadas lipídicas esféricas, contendo no seu interior uma solução aquosa, e foi descoberto por Bangham *et al.* em 1965. Geralmente, os lipossomas contêm lípidos catiónicos, que vão interagir eletrostaticamente com o mRNA, ou seja, a cabeça polar dos lípidos catiónicos interage com o grupo fosfato do mRNA, formando um complexo com multicamadas, passando a chamar-se de lipoplexos^{33,34}. (Figura 6) Foi demonstrado que os lipoplexos conferem proteção do mRNA contra a degradação das nucleases e qualquer tipo de interação que possa ocorrer³⁵, no entanto, não era totalmente eficaz. De modo a aumentar a eficácia da entrega e a proteção da molécula de mRNA, teria que se aprimorar os componentes que constituem este veículo.

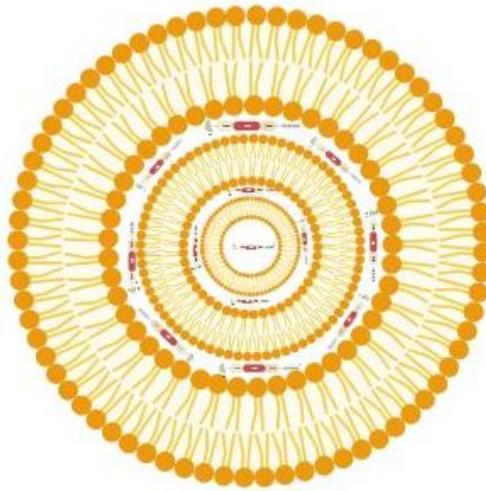


Figura 6 – Lipoplexô. Adaptado de Midoux *et al.*, 2015

Os lipossomas são a versão inicial das nanopartículas lipídicas (NPL), que nos dias atuais são dos veículos mais estudados, As NPL são constituídas principalmente por colesterol, lípidos catiónicos ionizáveis, fosfolípidos e derivados de poli(etilenoglicol) (PEG)²⁹. (Figura 7) Os lípidos catiónicos ionizáveis promovem a agregação e encapsulação do mRNA através das forças electroestáticas, protegendo-o da degradação das RNases, como também têm um papel na libertação eficiente do mRNA no citoplasma. Os fosfolípidos formam a bicamada lipídica e o colesterol intercala-se no meio dos fosfolípidos, contribuindo para a rigidez da bicamada, que conseqüentemente aumenta a estabilidade física e biológica das NPL. O PEG é responsável pelo aumento do tempo de semi-vida da nanopartícula, isto porque como é uma molécula extremamente hidrofílica, tem tendência a formar uma nuvem de água à volta da NPL, com isto, evita-se a ligação das opsoninas à nanopartícula, como também diminui a extensão de agregação durante a manufatura²⁰. Tendo em conta os constituintes das NPL, este veículo funde com a membrana celular das células alvo, neste caso as células cancerígenas, onde dentro da célula o pH vai diminuindo, a bicamada lipídica na vesícula começa a destabilizar e ocorre a libertação do mRNA no citoplasma da célula¹⁸.

As NPL como veículo de entrega apresenta vantagens perante os outros veículos pois é mais fácil de fabricar em grande escala, a sua capacidade de transfeção é controlada e progressiva, para além de ter uma toxicidade baixa e ser compatível com os diferentes tipos de ácidos nucleicos e diversos tamanhos¹³. No entanto, reduzir a toxicidade e regular a imunogenicidade ainda é algo que os investigadores tencionam melhorar neste tipo de veículo de entrega. As NPL foram usadas para o desenvolvimento das vacinas do COVID-19, com o progresso que houve, este sistema de entrega foi considerado um dos sistemas mais promissores e avançados como veículo de entrega das vacinas de mRNA na imunoterapia do cancro.

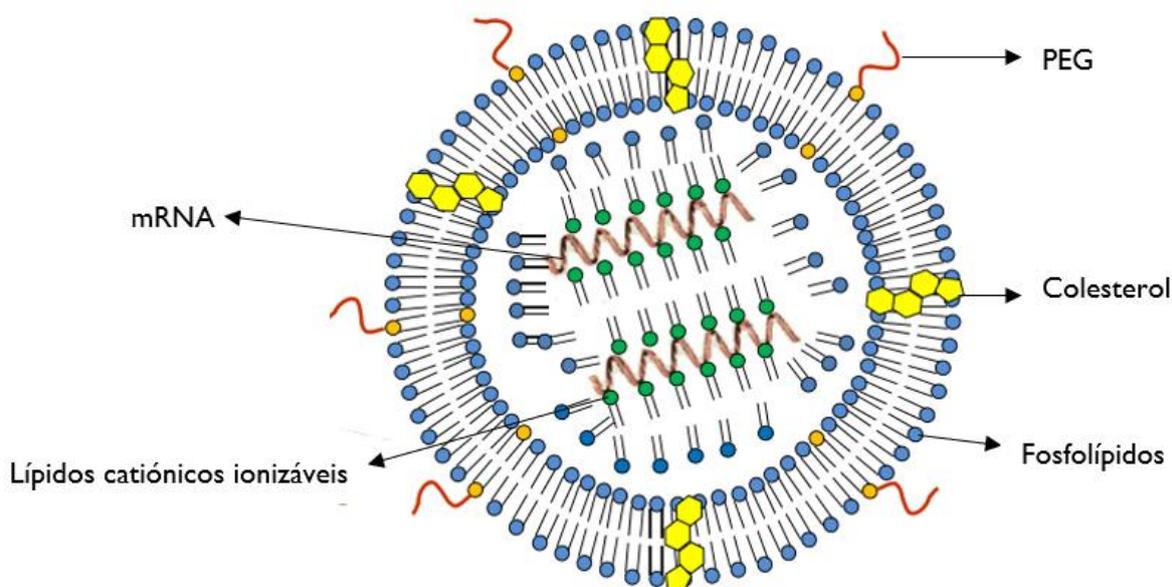


Figura 7 – Componentes da nanopartícula lipídica – As nanopartículas lipídicas são constituídas por lipídios catiónicos, PEG, colesterol e fosfolípidos. Adaptado de Ramachandran *et al.*, 2022

5.5. Nanopartículas híbridas

As nanopartículas híbridas (LPHNs) surgiram nesta última década e resultam na combinação de nanopartículas poliméricas com lípidos. Este veículo de entrega tem um núcleo de polímero que encapsula o fármaco, uma camada de lípidos que envolve o núcleo polimérico e uma camada lipídica externa com PEG. Esta última camada lipídica vai proteger o núcleo de degradação e prolongar o tempo de circulação³⁶. Este tipo de veículo surgiu como substituto dos outros veículos de entrega, isto porque foi considerado estável e biodegradável, para além de ter um tempo de circulação longo.

As LPHNs já foram utilizadas na transfeção de DC, tendo ocorrido com eficácia a tradução da proteína. Porém, a expressão do antigénio pretendido continua a ser superior nos outros veículos de entrega^{37,38}.

5.6. Exossomas

Os exossomas são uma classe homogénea de vesículas extracelulares com aproximadamente 30-150 nm, formam-se através de exocitose de corpos multivesiculares de todos os tipos de células e extraídos para os fluidos extracelulares como o sangue, urina, saliva, entre outros^{39,40}. Verificou-se que os exossomas conseguem transportar diferentes componentes, incluindo proteínas, lípidos e ácidos nucleicos^{41,42,43}.

Esta vesícula consegue reconhecer as células alvo, fundir-se com a membrana celular e consequentemente libertar o seu conteúdo para induzir uma resposta. Ainda não se conhece ao certo este mecanismo de ligação dos exossomas às células recetoras e posterior libertação do conteúdo, no entanto, aparenta ser acelerado pelo pH ácido e condições de hipóxia⁴⁴.

Relativamente aos métodos de carregamento dos exossomas, estes podem ser classificados como endógenos ou exógenos. Em relação ao carregamento endógeno, pode ser feito através da modificação da célula dadora para que sejam expressos os ácidos nucleicos pretendidos nos exossomas ou incubação com o conteúdo que pretendemos que seja entregue. Enquanto que o carregamento exógeno consiste na incorporação do conteúdo pretendido em exossomas que tenham sido previamente isolados⁴⁵.

A produção em larga escala de exossomas com mRNA incorporado é trabalhoso, visto que o mRNA é uma molécula demasiado grande para esta vesícula, a eletroporação não se demonstrou um método suficientemente eficiente para a internalização do mRNA dentro do exossoma, por isso recorreu-se ao complexo mRNA-lípidos catiónicos para que fosse possível internalizar este complexo nos exossomas⁴⁶.

Este tipo de veículo está se tornar promissor como sistema de entrega do mRNA na imunoterapia, visto que tem vantagens quando comparado com outros sistemas de entregas, como o caso das NPL. A parte vantajosa da utilização deste veículo é por ter menor imunogenicidade e toxicidade, atravessar mais facilmente a barreira biológica, podendo assim alcançar uma entrega do mRNA mais eficiente³⁹. Podiam ser desenvolvidas novas estratégias terapêuticas que envolvesse os exossomas e as NPL, de modo a aproveitar as vantagens destes sistemas de entregas.

6. Limitações das vacinas de mRNA

A utilização de mRNA como plataforma de vacinação é considerada recente, apesar de ter vindo a ter resultados promissores, no entanto, a toxicidade inerente a alguns componentes dos veículos de entrega, a via de administração e a imunossupressão tumoral constituem as maiores limitações desta tecnologia.

6.1. Toxicidade

A entrega do mRNA e a toxicidade provocada por esta tecnologia continuam a ser alguns dos desafios encontrados.

A presença de lípidos catiónicos em alguns veículos de entrega, proporciona a agregação destes com as moléculas de mRNA formando complexos estáveis, protegendo estas moléculas de serem degradadas. Apesar de já haver resultados favoráveis da utilização de NPL com lípidos catiónicos, como veículo de entrega da molécula de mRNA, ainda não é seguro na sua totalidade. Os lípidos catiónicos ionizáveis e os fosfolípidos podem apresentar um potencial tóxico^{47,48}, o PEG que é usado para aumentar a estabilidade da NPL como também da agregação destas, pode ter efeito imunogénico, como tal, pode induzir a produção de anticorpos da imunoglobulina M (IgM) anti-PEG, que provocam a opsonização destas nanopartículas pelos macrófagos⁴⁹.

6.2. Via de administração

Podemos considerar como outro desafio das vacinas de mRNA a via de administração mais adequada a ser utilizada, visto que o método de entrega determina tanto a distribuição da molécula do mRNA como a eficácia da vacina²⁹. Quando se recorre à via intradérmica e subcutânea, o mRNA é rapidamente processado pelas APC presentes na região, porém origina frequentemente reações no local da injeção²⁶. A administração intranasal do mRNA atinge as APC nos nódulos linfáticos periféricos, enquanto a via intranodal atinge diretamente as APC linfáticas, contudo ambos são métodos complicados e que permitem apenas injeções de volumes pequenos^{10,50}. A utilização da via intramuscular geralmente induz menos reações no local de injeção, como o tecido muscular é altamente vascularizado, contém células imunológicas que vão processar o mRNA²⁹. Através das injeções intravenosas o mRNA atinge os diversos órgãos linfáticos. Os ensaios clínicos que utilizaram esta via de administração demonstraram que houve uma resposta robusta pelas células T CD8, de tal forma, tornou-se

a o método de entrega que mais é utilizado nos ensaios clínicos para as vacinas de mRNA para o tratamento do cancro^{51,52,53}.

No entanto, apesar dos inúmeros ensaios clínicos realizados através da via intravenosa, a via intradérmica e intranodal continuam a ser consideradas as mais adequadas, apesar dos efeitos secundários que acarretam.

6.3. Imunossupressão tumoral

A resistência tumoral é um fator determinante para a eficácia das vacinas. Esta resistência pode ocorrer pela imunossupressão tumoral, que consiste na modulação negativa do sistema imunitário através da interação entre as células imunes e os constituintes do microambiente tumoral (TME), sendo que este mecanismo vai incrementar a progressão tumoral. Esta modulação pode ocorrer pela sobreexpressão de *immune checkpoint* (IC) e de células imunossupressoras⁵⁴.

6.3.1. Sobreexpressão de *immune checkpoint*

Os ICs são recetores que se encontram à superfície das células que regulam o sistema imunitário, como é o caso das células B, linfócitos T, células *natural killer*, entre outras⁵⁶ e normalmente, previnem respostas imunes excessivas⁵⁵. Os ICs mais comuns são a proteína da morte celular programada (PD-1), ligando da proteína da morte celular programada (PD-L1) e CTLA4.

Ao bloquear-se um IC, por mecanismos de inibição compensatória, aumenta conseqüentemente a expressão de outro IC nas células imunes, muito provavelmente este mecanismo é despoletado pelos componentes do TME e levam a uma resistência adquirida.

No entanto, tem-se vindo a estudar o uso de inibidores de ICs em conjunto com as vacinas de mRNA como potencial estratégia terapêutica, de modo a evitar a resistência tumoral. Assim, conseguindo prevenir essa resistência estamos a melhorar a eficácia da imunoterapia⁵⁴.

6.3.2. Células imunossupressoras

O TME é constituído por componentes que interagem entre eles: células tumorais e células do sistema imune, como os linfócitos T reguladores (T regs), células B reguladores (B

regs), macrófagos tumorais (TAMs), células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs), mastócitos tumorais (TAMCs), células dendríticas tumorais (TECs) e fibroblastos tumorais (CAFs). O TME pode constituir uma limitação à imunoterapia do cancro porque cria um ambiente à volta do tumor que favorece o crescimento e propagação deste. Isto acontece devido ao facto da interação entre as células tumorais e as células do sistema imunitário provocar a libertação de quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento e moléculas inibidoras⁵⁴.

Os linfócitos T regs, são um subtipo das células T CD4 com origem no timo e estão presentes em grande número nos tumores^{54,57}. Estes linfócitos imunossupressores consomem IL-2 e são responsáveis pelo aumento extracelular da adenosina e da expressão de ICs nas células imunes. O culminar destes mecanismos constitui uma ameaça à eficácia da imunoterapia, porque vão limitar a ativação e a consequente expansão clonal dos linfócitos T CD4 e T CD8^{54,58,59}.

De modo a arranjar uma solução para esta adversidade, realizou-se um tratamento experimental com baixas doses de ciclofosfamida, em que os resultados demonstraram a redução transitória dos níveis de Treg e o aumento da resposta das células T. Com isto, conseguimos perceber que é possível alterar o TME com a utilização de outros tipos de terapias, quimioterapia ou radioterapia⁶⁰.

7. Ensaios clínicos das vacinas de mRNA

Nas últimas décadas tem-se investido em vários estudos e desenvolvimentos pré-clínicos e clínicos para comprovar a eficácia na utilização de vacinas de mRNA no tratamento do cancro, ou seja, que as moléculas de mRNA tenham a capacidade de estimular uma resposta imune pelo próprio sistema imunitário do doente.

A tabela 2 resume os principais ensaios clínicos realizados por várias empresas que investem atualmente na área da imunoterapia do cancro, nomeadamente na criação de vacinas de mRNA.

Tabela 2- Ensaios clínicos de vacinas de mRNA para o cancro.

Instituição	NCT Number	Patologia	Proteína codificada	Veículo	Fase	Estado
BioNTech	NCT04163094	Cancro do ovário	34 AET	Lipossoma	Fase 1	Terminado
	NCT04526899	Melanoma	4 AET: NY-ESO-1; MAGE-A3; Tirosinase; TPTE	Lipoplexo	Fase 2	Recrutando
	NCT04382898	Cancro da próstata	5 AAT: PSA, PAP e 3 outros antigénios não revelados	Lipoplexo	Fase 1 Fase 2	A recrutar
CureVac	NCT03164772	NSCLC	6 mRNA diferentes	RNActive	Fase 1 Fase 2	Completo
	NCT00923312	NSCLC	5 mRNA diferentes	RNActive	Fase 1 Fase 2	Completo
	NCT02140138	Cancro da próstata	5 AET: NY-ESO-1; MAGE-C1; MAGE-C2; Survivin; 5T4	RNActive	Fase 2	Terminado
Moderna Tx	NCT03897881	Melanoma	34 AET	Lipossoma	Fase 2	Ativo, ainda não está a recrutar
Merck	NCT03323398	Cancro dos ovários, Tumores sólidos, linfomas	OX40L	NPL	Fase 1 Fase 2	Completo

National Cancer Institute (NCI)	NCT03480152	Melanoma; cancro do colon; Cancro gastrointestinal; Cancro geniturinário; Cancro hepatocelular	20 AET	NPL	Fase I Fase 2	Terminado
	NCT00890032	Neoplasia do sistema nervoso central recorrente	Não revelado	DC	Fase I	Completo
	NCT00626483	Neoplasia maligna do cérebro	pp65-LAMP	DC	Fase I	Completo
University of Florida	NCT05264974	Melanoma	Não revelado	Lipossoma	Fase I	Ainda não está a recrutar
	NCT00906243	Cancro da próstata	4 AET: PSA; PSCA; PSMA; STEAPI	RNActive	Fase I Fase 2	Terminado
	NCT04573140	Glioblastoma no adulto	pp65-LAMP	Lipossoma	Fase I Fase 2	Recrutando

	NCT05660408	Osteossarcoma pulmonar	Não revelado	NPL	Fase 1 Fase 2	Ainda não está a recrutar
Stemirna Therapeutics	NCT03908671	Cancro esofágico; NSCLC	AET	NA	NA	Desconhecido
	NCT05198752	Tumor sólido	Não revelado	NA	Fase 1	Recrutando
Radboud University Medical Center	NCT01530698	Melanoma	gp100; tirosinase, forma ativaTLR4; CD70	DC	Fase 1 Fase 2	Completo
<p><i>LAMP- proteína associada à membrana lisossomal; MAGE-A3- antígeno A3 associado ao melanoma; MAGE-C1 - antígeno C1 associado ao melanoma ; MAGE-C2 - antígeno C2 associado ao melanoma; NA- not applicable; NSCLC- non small cell lung cancer; PAP – fosfatase ácida prostática; PSA – antígeno específico da próstata ;PSCA – antígeno das células-tronco da próstata; PSMA - antígeno de membrana prostática específica; STEAPI – seis antígenos epiteliais transmembranares da próstata ;TPTE – proteína tirosina fosfatase; 5T4 – glicoproteína trofoblástica</i></p> <p>Esta tabela sumariza alguns dos ensaios clínicos presentes no site ClinicalTrials.gov a 28 junho 2023.</p>						

Os ensaios clínicos em curso e os que já foram dados como concluídos podem envolver tanto vacinas de mRNA personalizadas para o cancro, mais propriamente para a codificação dos antígenos de interesse, como vacinas de mRNA para o cancro à base de DCs, ou seja, utilizam as DCs que foram isoladas do doente, transfectadas com o mRNA e posteriormente voltaram a ser inseridas no corpo do hospedeiro. De seguida, são apresentados alguns exemplos de ensaios clínicos que envolvam estes dois tipos de vacinas.

7.1. Vacinas de mRNA personalizadas para o cancro

Primeiramente, para ser feita a formulação da vacina temos de realizar uma biopsia ao tumor e posteriormente identificar os AET através do sequenciamento das amostras retiradas. De seguida, é avaliada a afinidade dos antígenos às moléculas de MHC I e MHC II. A identificação destes antígenos é realizada através da comparação de sequências do exoma do tecido tumoral com o do tecido saudável. Após a identificação dos neoantígenos com maior afinidade para as moléculas de MHC, é formulado a molécula de mRNA que codifica os neoantígenos de interesse, pois apresenta uma grande probabilidade de gerar respostas eficientes por parte das células T contra as células cancerígenas²³.

Atualmente, existe um ensaio de fase 3 em andamento entre as indústrias farmacêuticas *Moderna Therapeutics* e a *Merck Sharp & Dohme*, que envolve a vacina V940 (mRNA-4157), uma terapia individualizada que codifica 34 neoantígenos, em combinação com KEYTRUDA (pembrolizumab), uma terapia anti-PD I da Merck, para o tratamento do melanoma. O objetivo deste ensaio é saber se a administração da vacina contendo mRNA-4157 em conjunto com o pembrolizumab é mais eficaz do que o pembrolizumab isolado em doentes com alto risco de recidiva do melanoma⁶¹. Anteriormente, ou seja, durante o ensaio de fase 2, foi utilizada a mesma molécula de mRNA com o objetivo de avaliar se a associação com o pembrolizumab aumenta o tempo sem que ocorra uma recidiva, onde os resultados demonstraram uma redução de risco de recidiva ou morte em cerca de 44% com a utilização da terapêutica quando comparado com o tratamento só com o KEYTRUDA. Os resultados dos efeitos adversos mantiveram-se desde os ensaios de fase I, ou seja, os efeitos adversos relacionados com o tratamento ocorreram em 14,4% dos doentes que receberam a combinação mRNA-4157 e KEYTRUDA em comparação com 10% dos doentes que só receberam KEYTRUDA⁶².

7.2. Vacinas de mRNA à base de células dendríticas

Nesta tecnologia, as DC devem ser manipuladas *ex-vivo*, onde lhe vai ser transfectado o mRNA com o antígeno que se pretende codificar, podemos utilizar o mRNA que se isolou da biópsia ao tecido tumoral. O desempenho deste tipo de vacinas depende do grau de diferenciação das DCs utilizadas, pelo antígeno que queremos codificar, pela via de administração escolhida e pelos adjuvantes utilizados⁶³.

Nas últimas décadas, têm sido desenvolvidos diversos ensaios clínicos com vacinas à base de DCs para vários cancros, como o melanoma, carcinoma das células renais, leucemia mieloide aguda, entre outros.

De forma a induzir a maturação das DC e aumentar a estimulação das células T, foi desenvolvida a formulação TriMix, que consiste em moléculas de mRNA que codificam adjuvantes imunoestimuladores, o ligando CD40 (CD40L), CD70 e a forma constitutiva ativa de TLR4. Esta formulação pode ser eletroporada em combinação com a molécula mRNA que codifica o antígeno de interesse. Existem também ensaios clínicos em doentes com melanoma que envolvem a administração de TriMix em DCs derivadas de monócitos co-eletroporadas com mRNA que codifica antígenos do melanoma, como antígeno específico da linhagem de melanócitos (gp100), tirosinase, antígeno A3 associado ao melanoma (MAGE-A3) e antígeno C2 associado ao melanoma (MAGE-C2). Esta estratégia ficou denominada como TriMixDC-MEL⁶⁶.

A imunoterapia TriMixDC-MEL foi utilizada conjuntamente com anti-CTLA-4 mAb, denominado ipilimumab, num estudo de fase 2. O objetivo deste estudo é detetar respostas das células T induzidas pela TriMixDC-MEL no sangue periférico de 39 doentes com melanoma. Os resultados obtidos demonstraram que 8 (20,5%) utentes obtiveram resposta completa ao tratamento e 7 (17,9%) obtiveram apenas uma resposta parcial, ou seja, só cerca de 38% demonstraram uma resposta tumoral⁶⁴. Estes resultados podem ser considerados promissores tendo em conta que o ipilimumab em monoterapia tem uma taxa normal de resposta geralmente inferior a 20%⁶⁵.

Estão ainda a serem desenvolvidos estudos para associar o TriMixDC-MEL com mAbs anti-PD1, pois estes demonstraram ser mais seguros e eficazes quando comparados com os anti-CTLA4⁶⁴.

8. Conclusão

Atualmente, as moléculas de mRNA, mais concretamente as vacinas de mRNA viradas para a imunoterapia do cancro, despertaram maior atenção dos investigadores, muito em parte devido ao sucesso obtido pela formulação das vacinas para o Sars-Cov-2.

Devido à quantidade extensiva de ensaios clínicos que têm ocorrido permitiu-se descobrir a funcionalidade do mRNA no tratamento do cancro, como os diversos veículos responsáveis pela entrega desta molécula. As principais empresas de biotecnologia que mais tem investido a explorar o potencial revolucionário das vacinas de mRNA na área da oncologia são a *Moderna Therapeutics* em conjunto com a *Merck & Co.*, *Cure Vac AG*, *BioNThech*, *Acuitas Therapeutics*, entre outros, inclusive parcerias com algumas Universidades.

Apesar dos resultados promissores, é importante ressaltar que o desenvolvimento deste tipo de vacinas para o cancro ainda é recente, ainda existem muitos aspetos desta tecnologia que têm de ser otimizados, desde modificações no ácido nucleico em questão, para permitir uma máxima eficácia na tradução da molécula de mRNA em proteína, como também evitar ser degradada até chegar ao citoplasma das células e o veículo de entrega ideal, visto que este não deve provocar citotoxicidade, assim como eleger a via de administração que demonstre maior eficácia na entrega e expressão de proteína.

Em suma, podemos esperar um futuro promissor com o uso das vacinas de mRNA na imunoterapia do cancro, têm potencial para alterar a maneira como tratamos o cancro, oferecendo uma nova abordagem terapêutica mais personalizada.

Bibliografia

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION - Cancer: Overview [Acedido a 3 de março 2023] Disponível em https://www.who.int/health-topics/cancer/#tab=tab_1.
2. NATIONAL CANCER INSTITUTE - What it is cancer? [Acedido a 3 de março 2023] Disponível em <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
3. ERALP, Y. - Application of mRNA Technology in Cancer Therapeutics. *Vaccines*. ISSN 2076393X. 10:8 (2022). doi: 10.3390/vaccines10081262.
4. SMALL, E. *et al.* - Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with Sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*. ISSN 0732183X. 24:19 (2006) 3089–3094. doi: 10.1200/JCO.2005.04.5252.
5. MIAO, L.; ZHANG, Y.; HUANG, L. - mRNA vaccine for cancer immunotherapy. [S.l.] : Molecular Cancer, 2021
6. LIU, J. *et al.* - Cancer vaccines as promising immuno-therapeutics: platforms and current progress. [S.l.] : BioMed Central, 2022 Disponível em <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01247-x>. ISBN 1304502201.
7. SAHIN, Ugur *et al.* - Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. [S.l.] : Nature Publishing Group, 2017
8. JAHANAFROOZ, Zohreh *et al.* - Comparison of DNA and mRNA vaccines against cancer. [S.l.] : Elsevier Ltd, 2020 Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.12.003>.
9. SUSCHAK, J. J.; WILLIAMS, J. A.; SCHMALJOHN, C. S. - Advancements in DNA vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity. [S.l.] : Taylor & Francis, 2017
10. PARDI, N. *et al.* - mRNA vaccines-a new era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery*. ISSN 14741784. 17:4 (2018) 261–279. doi: 10.1038/nrd.2017.243.
11. KOWALSKI, P. S. *et al.* - Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. [S.l.] : Elsevier Ltd., 2019 Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.02.012>.
12. SELMI, A. *et al.* - Uptake of synthetic naked RNA by skin-resident dendritic cells via macropinocytosis allows antigen expression and induction of T-cell responses in mice. [S.l.]

: Springer Berlin Heidelberg, 2016

13. GOTE, V. *et al.* - A Comprehensive Review of mRNA Vaccines | Enhanced Reader. (2023).
14. RAMANATHAN, A. ; ROBB, G. B.; CHAN, S. H. - mRNA capping: Biological functions and applications
15. CHATTERJEE, S.; PAL, J. K. - Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases
16. VISHWESHWARAIAH, Y. L.; DOKHOLYAN, N. V - mRNA vaccines for cancer immunotherapy. December (2022) 1–10. doi: 10.3389/fimmu.2022.1029069.
17. ANDRIES, O. *et al.* - N1-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice. *Journal of Controlled Release*. ISSN 18734995. 217:2015) 337–344. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.08.051.
18. XU, S. *et al.* - mRNA vaccine era—mechanisms, drug platform and clinical prospection. ISBN 1886183031.
19. GODISKA, R. *et al.* - Linear plasmid vector for cloning of repetitive or unstable sequences in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*. ISSN 03051048. 38:6 (2009) 1–9. doi: 10.1093/nar/gkp1181.
20. DENG, Z. *et al.* - mRNA Vaccines: The Dawn of a New Era of Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. ISSN 16643224. 13:June (2022) 1–15. doi: 10.3389/fimmu.2022.887125.
21. CHAKRABORTY, C. *et al.* - From COVID-19 to Cancer mRNA Vaccines: Moving From Bench to Clinic in the Vaccine Landscape. *Frontiers in Immunology*. ISSN 16643224. 12:July (2021) 1–17. doi: 10.3389/fimmu.2021.679344.
22. FAYEZ, N. A. *et al.* - Recent Advancement in mRNA Vaccine Development and Applications. *Pharmaceutics*. ISSN 19994923. 15:7 (2023) 1–24. doi: 10.3390/pharmaceutics15071972.
23. PASTOR, F. *et al.* - An rna toolbox for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. ISSN 14741784. 17:10 (2018) 751–767. doi: 10.1038/nrd.2018.132.
24. HEINE, A. ; JURANEK, S. ; BROSSART, P. - Clinical and immunological effects of

mRNA vaccines in malignant diseases. *Molecular Cancer*. ISSN 14764598. 20:1 (2021) 1–20. doi: 10.1186/s12943-021-01339-1.

25. FIEDLER, K. *et al.* - mRNA cancer vaccines. *Recent Results in Cancer Research*. ISSN 21976767. 209:2016) 61–85. doi: 10.1007/978-3-319-42934-2_5.

26. HE, Q. *et al.* - mRNA cancer vaccines: Advances, trends and challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. ISSN 22113843. 12:7 (2022) 2969–2989. doi: 10.1016/j.apsb.2022.03.011.

27. JAHANAFROOZ, Z. *et al.* - Comparison of DNA and mRNA vaccines against cancer. 25:3 (2021) 552–560. doi: 10.1016/j.drudis.2019.12.003.Comparison.

28. MEI, Y. ; WANG, X. - RNA modification in mRNA cancer vaccines. *Clinical and Experimental Medicine*. ISSN 15919528. 0123456789 (2023). doi: 10.1007/s10238-023-01020-5.

29. LORENTZEN, C. L. *et al.* - Clinical advances and ongoing trials of mRNA vaccines for cancer treatment. January (2020).

30. GEHL, J. - Electroporation: Theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiologica Scandinavica*. ISSN 00016772. 177:4 (2003) 437–447. doi: 10.1046/j.1365-201X.2003.01093.x.

31. JIANG, X. T.; LIU, Q.- mRNA vaccination in breast cancer: current progress and future direction. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. ISSN 14321335. 0123456789 (2023). doi: 10.1007/s00432-023-04805-z.

32. NITIKA; WEI, J. ; HUI, A. M. - The Delivery of mRNA Vaccines for Therapeutics. *Life*. ISSN 20751729. 12:8 (2022). doi: 10.3390/life12081254.

33. SUN, H. *et al.* - mRNA-Based Therapeutics in Cancer Treatment. *Pharmaceutics*. ISSN 19994923. 15:2 (2023) 1–38. doi: 10.3390/pharmaceutics15020622.

34. LIU, T. ; LIANG, Y. ; HUANG, L. - Development and Delivery Systems of mRNA Vaccines. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. ISSN 22964185. 9:July (2021) 1–10. doi: 10.3389/fbioe.2021.718753.

35. CROWLEY, S. T. *et al.* - Efficient Expression of Stabilized mRNAPEG-Peptide Polyplexes in Liver. 22:12 (2016) 319–335. doi: 10.1038/gt.2015.68.

36. DAVE, V. *et al.* - Lipid-polymer hybrid nanoparticles: Synthesis strategies and

biomedical applications. *Journal of Microbiological Methods*. ISSN 18728359. 160:March (2019) 130–142. doi: 10.1016/j.mimet.2019.03.017.

37. YASAR, H. *et al.* - Kinetics of mRNA delivery and protein translation in dendritic cells using lipid-coated PLGA nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology*. ISSN 14773155. 16:1 (2018) 1–19. doi: 10.1186/s12951-018-0401-y.

38. LIU, Y. *et al.* - Responsive Nanocarriers as an Emerging Platform for Cascaded Delivery of Nucleic Acids to Cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*. ISSN 18728294. 115:2017) 98–114. doi: 10.1016/j.addr.2017.03.004.

39. SALEH, A. F. *et al.* - Extracellular vesicles induce minimal hepatotoxicity and immunogenicity. *Nanoscale*. ISSN 20403372. 11:14 (2019) 6990–7001. doi: 10.1039/c8nr08720b.

40. HAN, G. *et al.* - Advances in mRNA therapeutics for cancer immunotherapy: From modification to delivery. January (2020).

41. PAROLINI, I. *et al.* - Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*. ISSN 00219258. 284:49 (2009) 34211–34222. doi: 10.1074/jbc.M109.041152.

42. MORELLI, A. E. *et al.* - Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*. ISSN 00064971. 104:10 (2004) 3257–3266. doi: 10.1182/blood-2004-03-0824.

43. FENG, D. *et al.* - Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic*. ISSN 13989219. 11:5 (2010) 675–687. doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01041.x.

44. AILUNO, G. *et al.* - Exosomes and Extracellular Vesicles as Emerging Theranostic Platforms in Cancer Research. *Cells*. 9:2569 (2020) 1–24.

45. ZHANG, Y. F. ; SHI, J. B. ; LI, C. - Small extracellular vesicle loading systems in cancer therapy: Current status and the way forward. *Cytotherapy*. ISSN 14772566. 21:11 (2019) 1122–1136. doi: 10.1016/j.jcyt.2019.10.002.

46. TSAI, S. J. *et al.* - Exosome-mediated mRNA delivery in vivo is safe and can be used to induce SARS-CoV-2 immunity. *Journal of Biological Chemistry*. ISSN 1083351X. 297:5 (2021) 101266. doi: 10.1016/j.jbc.2021.101266.

47. CAMPANI, V. ; GIARRA, S.; ROSA, G. D. - Lipid-based core-shell nanoparticles: Evolution and potentialities in drug delivery. *OpenNano*. ISSN 23529520. 3:September 2017 (2018) 5–17. doi: 10.1016/j.onano.2017.12.001.
48. REICHMUTH, A. M.; OBERLI, M. A. - mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. *Therapeutic Delivery*. ISSN 2041-5990. 7:2016) 319–334.
49. ISHIDA, T. *et al.* - Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. *Journal of Controlled Release*. ISSN 01683659. 112:1 (2006) 15–25. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.01.005.
50. HOU, X. *et al.* - Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nature Reviews Materials*. ISSN 20588437. 6:12 (2021) 1078–1094. doi: 10.1038/s41578-021-00358-0.
51. SAYOUR, E. J. *et al.* - Systemic activation of antigen-presenting cells via RNA-Loaded nanoparticles. *Oncot Immunology*. ISSN 2162402X. 6:1 (2017) 1–14. doi: 10.1080/2162402X.2016.1256527.
52. BROOS, K. *et al.* - Particle-mediated Intravenous Delivery of Antigen mRNA Results in Strong Antigen-specific T-cell Responses Despite the Induction of Type I Interferon. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. ISSN 21622531. 5:January (2016) 1–11. doi: 10.1038/mtna.2016.38.
53. KRANZ, L. M. *et al.* - Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature*. ISSN 14764687. 534:7607 (2016) 396–401. doi: 10.1038/nature18300.
54. SALEH, R.; ELKORD, E. - Acquired resistance to cancer immunotherapy: Role of tumor-mediated immunosuppression. *Seminars in Cancer Biology*. ISSN 10963650. 65:July 2019 (2020) 13–27. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.07.017.
55. PETERS, R. ; YANASE, Y. - The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Physical Review B*. ISSN 24699969. 97:11 (2018) 252–264. doi: 10.1103/PhysRevB.97.115128.
56. MELERO, I. *et al.* - Therapeutic vaccines for cancer: An overview of clinical trials. *Nature Reviews Clinical Oncology*. ISSN 17594782. 11:9 (2014) 509–524. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.111.
57. RÜTTINGER, D. *et al.* - Immunotherapy of Cancer: Key Findings and Commentary

on the Third Tegernsee Conference. *The Oncologist*. ISSN 1083-7159. 15:1 (2010) 112–118. doi: 10.1634/theoncologist.2009-0213.

58. OHTA, A.; SITKOVSKY, M. - Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells

59. CHINEN, T. *et al.*- An essential role for IL-2 receptor in regulatory T cell function Takatoshi

60. MELERO, I. *et al.* - Therapeutic vaccines for cancer: An overview of clinical trials. *Nature Reviews Clinical Oncology*. ISSN 17594782. 11:9 (2014) 509–524. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.111.

61. MODERNA - A Clinical Study of V940 Plus Pembrolizumab in People With High-Risk Melanoma (V940-001) - [Consult. 13 ago. 2023]. Disponível em <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05933577>.

62. MODERNA - Merck and Moderna Initiate Phase 3 Study Evaluating V940 (mRNA-4157) in Combination with KEYTRUDA® (pembrolizumab) for Adjuvant Treatment of Patients with Resected High-Risk (Stage IIB-IV) Melanoma - [Consult. 10 ago. 2023]. Disponível em <https://investors.modernatx.com/news/news-details/2023/Merck-and-Moderna-Initiate-Phase-3-Study-Evaluating-V940-mRNA-4157-in-Combination-with-KEYTRUDA-pembrolizumab-for-Adjuvant-Treatment-of-Patients-with-Resected-High-Risk-Stage-IIB-IV-Melanoma/default.aspx>.

63. FRANKENBERGER, ; SCHENDEL, J. - Third generation dendritic cell vaccines for tumor immunotherapy [S.l.] : Elsevier GmbH., 2012 Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.01.012>.

64. KEERSMAECKER, *et al.* - TriMix and tumor antigen mRNA electroporated dendritic cell vaccination plus ipilimumab: Link between T-cell activation and clinical responses in advanced melanoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. ISSN 20511426. 8:1 (2020). doi: 10.1136/jitc-2019-000329.

65. HODI, *et al.* - Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial [S.l.] : Elsevier Ltd, 2018 Disponível em [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30700-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30700-9).

66. LINT, *et al.* - Optimized dendritic cell-based immunotherapy for melanoma: The

TriMix-formula