



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Diana Lages Barroso Abreu

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Vacinas de mRNA: uma nova geração de vacinas para a gripe” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação do Dr. Diogo Dias, da Dra. Márcia Silva e da Professora Doutora Olga Maria Fernandes Borges Ribeiro, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Diana Lages Barroso Abreu

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Vacinas de mRNA: uma nova geração de vacinas para a gripe” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação do Dr. Diogo Dias, da Dra. Márcia Silva e da Professora Doutora Olga Maria Fernandes Borges Ribeiro, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2022

Eu, Diana Lages Barroso Abreu, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2017265335, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Vacinas de mRNA: uma nova geração de vacinas para a gripe” apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 1 de setembro de 2022.

Diana Lages Barroso Abreu

(Diana Lages Barroso Abreu)

Agradecimentos

Chega ao fim o meu percurso académico, a fase mais desafiante e bonita da minha vida, que lembrarei para sempre com saudade. Resta-me agradecer a todos aqueles que de algum modo fizeram parte dele e o tornaram inesquecível:

À minha irmã, a minha melhor amiga, a pessoa mais presente, por tudo o que ela representa para mim e por ser sempre e para sempre o meu porto seguro.

Aos meus pais pelo apoio incondicional, por aplaudirem todas as minhas conquistas e por me darem ânimo nos momentos mais difíceis.

Ao meu avô, a pessoa mais especial, por me guiar e por me dar sempre as palavras mais sábias.

À minha avó, a pessoa que mais orgulho sentiria nesta fase, por tudo aquilo que me ensinou e mesmo já não estando entre nós, por representar para sempre a minha força.

Às minhas amigas de sempre, Bé e Tita, por tudo o que já vivemos juntas e por apoiarem sempre as minhas decisões. À Duda, pelas longas conversas e viagens e por estar sempre disponível para me ajudar.

Às amigas que Coimbra me deu e que são as melhores pessoas que alguém poderia ter encontrado. À Maria, por ser a minha companheira de todos os momentos. À Pipa, por ser a pessoa que melhor que me entende. À Marta, por ser a minha maior cúmplice. À Gil, por ser o ombro amigo. Às afilhadas, pela confiança e carinho.

À equipa da Farmácia dos Olivais, que para além de mentores se tornaram amigos, por me terem proporcionado um período de estágio extremamente enriquecedor que considerei essencial para o meu futuro profissional.

À equipa da DGRM do INFARMED, I.P., pela grande oportunidade e aprendizagem contínua que me ofereceram.

À Professora Doutora Olga Borges, a minha excelente orientadora, pela constante disponibilidade, compreensão e auxílio em todo o processo de elaboração da monografia.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e a todo o pessoal docente e não docente, por ter sido uma segunda casa e por me terem proporcionado uma formação de excelência.

A Coimbra, cidade do meu coração, onde cheguei uma menina cheia de sonhos e saio uma mulher, igualmente sonhadora, mas preparada para tudo o que a vida me reserva.

Coimbra, sinto-me orgulhosa de fazer parte da tua história.

Índice

PARTE I - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	7
Introdução	8
1. A Farmácia dos Olivais	8
2. Análise SWOT	9
2.1. Pontos Fortes	9
2.1.1. Diversidade das tarefas desempenhadas	9
2.1.2. Diversidade de casos práticos	10
2.1.3. Equipa	11
2.1.4. Aplicação de conhecimentos adquiridos no plano de estudos do MICE	11
2.1.5. Organização e gestão documental e do espaço físico	11
2.2. Pontos Fracos	12
2.2.1. Preparação de manipulados	12
2.2.2. Tempo dispensado em procedimentos relacionados com a testagem à COVID-19	12
2.2.3. Número de receitas manuais	12
2.3. Oportunidades	13
2.3.1. Formações complementares	13
2.3.2. Contacto com ambas as versões do sistema informático Sifarma®	13
2.3.3. Diversidade de produtos de dermofarmácia e cosmética	14
2.4. Ameaças	14
2.4.1. Concorrência com outros locais de venda de MNSRM	14
2.4.2. Medicamentos esgotados	14
2.4.3. Situação pandémica causada pelo SARS-CoV-2	15
Casos Práticos	15
Conclusão	18
Bibliografia	19
Anexo	20

PARTE II - Relatório de estágio no INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

Lista de Abreviaturas	22
Introdução	23
1. O INFARMED, I.P. e a DGRM	23
2. Análise SWOT	25
2.1. Pontos Fortes	25
2.1.1. Plano de formação inicial	25
2.1.2. Diversidade das tarefas desempenhadas	25
2.1.3. Aplicação dos conhecimentos adquiridos nas unidades curriculares	26
2.1.4. Equipa	27
2.1.5. Sistema de Gestão da Qualidade	27
2.2. Pontos Fracos	27
2.2.1. Falha das plataformas e aparelhos eletrónicos	27
2.2.2. Ausência de sessão de boas-vindas e de interação com outras direções do Infarmed	28
2.2.3. Falta de recursos humanos	28

2.2.4. Duração do estágio	28
2.3. Oportunidades	29
2.3.1. Formações e palestras proporcionadas	29
2.3.2. Desenvolvimento de competências a nível informático.....	29
2.3.3. Desenvolvimento de um trabalho de investigação.....	30
2.3.4. Comunicação com os <i>Stakeholders</i>	30
2.3.5. Mudança de R2 para R3 do ICH E2B com alterações ao nível do Portal RAM	30
2.4. Ameaças.....	31
2.4.1. Quantidade e qualidade das notificações de RAM	31
2.4.2. Funcionamento das URF	31
Conclusão.....	31
Bibliografia	33
Anexos	34
Parte III - Monografia "Vacinas de mRNA: uma nova geração de vacinas para a gripe"	
Lista de Abreviaturas	37
Resumo	39
Abstract	40
Introdução.....	41
1. Vírus Influenza.....	42
2. Vacinação contra a gripe.....	44
2.1. História do desenvolvimento das vacinas	44
2.2. Produção das vacinas	45
2.3. Tipos de vacinas.....	46
2.3.1. Vacinas inativadas.....	46
2.3.2. Vacinas vivas atenuadas	46
2.3.3. Vacinas de HA recombinante (rHA)	46
2.4. Limitações das vacinas tradicionais.....	46
3. Vacinas de mRNA na prevenção da gripe.....	49
3.1. Produção de vacinas de mRNA.....	49
3.2. Tipos de vacinas de mRNA e resultados pré-clínicos.....	52
3.2.1. Vacinas de mRNA não replicante	52
3.2.2. Vacinas de mRNA auto-replicante (sa-mRNA)	55
3.3. Ensaios clínicos.....	57
4. Perspetivas futuras e notas conclusivas.....	62
Bibliografia	65
Anexo.....	74

PARTE I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia dos Olivais

Coimbra



**FARMÁCIA
DOS OLIVAIS**

Sob orientação do Dr. Diogo Dias

Lista de Abreviaturas

FC – Farmácia Comunitária

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

IMC – Índice de Massa Corporal

INR – *International Normalized Ratio*

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MSRM – Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

PIM – Preparação Individualizada da Medicação

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

TRAG – Testes Rápidos de Antigénio

Introdução

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) finaliza com uma componente de estágio obrigatória em Farmácia Comunitária (FC) (I). Esta componente prática possibilita uma maior aproximação ao mercado de trabalho sendo fundamental na formação de qualquer mestre em ciências farmacêuticas.

A vasta formação técnica e científica dos farmacêuticos possibilita-lhes desenvolver um conjunto de saberes que lhes permite atuar em diferentes áreas. A FC representa a atividade farmacêutica com maior representatividade pela quantidade de profissionais que absorve e pela importância que as farmácias apresentam como estrutura de saúde de proximidade (2,3).

De janeiro a abril de 2022 tive a oportunidade de realizar o meu estágio curricular em FC na Farmácia dos Olivais, situada em Coimbra, sob orientação do Dr. Diogo Dias e apoio dos restantes colaboradores. Durante este período de 4 meses recolhi e coloquei em prática ensinamentos que considero imprescindíveis para o meu futuro profissional.

No presente relatório irei começar por fazer uma contextualização da instituição que me acolheu como estagiária, seguindo-se uma análise crítica do período de estágio sob a forma de modelo SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), finalizando com a opinião global desta experiência.

I. A Farmácia dos Olivais

A Farmácia dos Olivais situada na rua Bernardo Albuquerque n.º 141 em Santo António dos Olivais, distrito de Coimbra, é propriedade da empresa Cristina Almiro e Castro – Farmácia, Unipessoal Lda., da qual fazem parte mais duas farmácias e uma parafarmácia. A direção técnica encontra-se a cargo do farmacêutico Dr. Diogo Dias e a gerência é assegurada pelo farmacêutico Dr. Ricardo Parreira. Fazem parte da equipa os farmacêuticos substitutos Dra. Ana Brandão, Dra. Catarina Silva, Dra. Joana Santos, Dra. Mariana Duarte, Dra. Bárbara Costa e Dr. Guilherme Arrais, os técnicos de farmácia Dr. José Rafael Manuel e Dra. Sara Martins e a técnica de limpeza D. Fátima Frias.

Encontra-se aberta ao público todos os dias do ano até às 24 horas. A sua localização na proximidade de centros hospitalares e centros de saúde, bem como o seu horário alargado conferem-lhe uma grande afluência de utentes.

A farmácia dispõe de uma sala de atendimento ao público com quatro balcões disponíveis, um local de armazenamento de medicamentos e produtos farmacêuticos, um laboratório, instalações sanitárias, zona de recolhimento e um gabinete de atendimento

personalizado, cumprindo com as áreas mínimas de uma farmácia, de acordo com a Deliberação n.º 1502/2014, de 3 de julho (4).

Dentro dos vários serviços prestados pela farmácia destacam-se os seguintes serviços especiais: realização de testes rápidos de antigénio (TRAG) para deteção da COVID-19 comparticipados; entregas ao domicílio; administração de vacinas e injetáveis; medição de determinados parâmetros como peso, índice de massa corporal (IMC), pressão arterial, glicémia, colesterol, triglicerídeos e *internacional normalized ratio* (INR); cessação tabágica; preparação individualizada da medicação (PIM); e consultas de nutrição.

A Farmácia dos Olivais apresenta um espaço agradável com profissionais qualificados pautados pelo rigor e profissionalismo com uma assídua boa disposição, em que o propósito máximo é a satisfação dos seus utentes.

2. Análise SWOT

A apreciação global do estágio irá seguir o modelo SWOT que permite avaliar a nível interno os pontos fortes (*Strengths*) e fracos (*Weaknesses*) e a nível externo as oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*) que notei no seu decorrer.

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Diversidade das tarefas desempenhadas

O estágio iniciou-se num período de grande afluência à farmácia justificada, maioritariamente, pela realização de TRAG para deteção de COVID-19 comparticipados. Como já tinha realizado estágios em FC anteriormente, já estava familiarizada com determinados processos realizados diariamente na farmácia assim como com o atendimento ao público. Todavia, e apesar do tempo limitado dos colaboradores, o estágio iniciou-se com a devida apresentação da farmácia e dinâmica da equipa e explicação do funcionamento do sistema informático Sifarma® e dos processos principais de *backoffice*. Assim, os primeiros dias foram ocupados com a gestão e receção das encomendas provenientes dos fornecedores e respetiva organização e arrumação, procedimentos que considerei fundamentais para uma maior preparação de um bom atendimento ao público.

Devido a esta preparação que trazia de estágios anteriores e que consolidei nos primeiros dias, e pelo facto da equipa me dar total liberdade para avançar para determinadas tarefas quando me sentisse preparada, o atendimento ao público foi tarefa assídua do meu estágio desde o seu início, o que considerei um dos grandes pontos fortes desta experiência.

Sendo estas as tarefas principais realizadas em FC, ocuparam grande parte do meu estágio, contudo tive a possibilidade de acompanhar e realizar muitas outras necessárias para o funcionamento adequado do estabelecimento.

No *backoffice* atendi telefonemas diariamente nos quais solucionei problemas, esclareci dúvidas e dei informações com a supervisão da equipa da farmácia. Também ao nível do *backoffice*, com o apoio do Sifarma[®], fiz verificação de validades, gestão de devoluções, realização de transferências de produtos entre farmácias do mesmo grupo e assisti à verificação de receitas manuais com o fecho dos lotes e emissão dos verbetes. Procedi ainda à recolha da VALORMED, projeto que permite a recolha de medicamentos fora de uso ou de prazo ao nível das farmácias. Graças aos diferentes serviços proporcionados pela Farmácia dos Olivais tive a oportunidade de assistir à PIM realizada a pedido de alguns utentes e ainda à preparação de uma declaração de gastos mensais. Para além disto, consegui acompanhar um fecho do mês e presenciar todos os procedimentos que lhe são inerentes.

Ao nível do atendimento, para além da indicação terapêutica que coloquei em prática e as capacidades de comunicação e de relação interpessoal, foi possível realizar a gestão de reservas, fazer a preparação de antibióticos no momento da dispensa e realizar determinados serviços que a farmácia tem disponíveis tais como a medição de parâmetros bioquímicos.

Para além destas, foram tarefas frequentes no decorrer do estágio, o registo e controlo da temperatura e humidade em diferentes zonas da farmácia, assim como a gestão e organização de lineares e montras que estão em constante mutação dentro deste estabelecimento. O conjunto diversificado de tarefas desempenhadas foram fundamentais para marcar o meu estágio como uma experiência extremamente positiva e para me preparar adequadamente para o meu futuro profissional em FC.

2.1.2. Diversidade de casos práticos

Como referi anteriormente, o horário e localização da farmácia permitem uma grande afluência de um leque variado de utentes que requerem um atendimento personalizado. Tive a oportunidade de poder estagiar em dias de fim de semana e feriados assim como em horários mais noturnos, o que diversificou o tipo de atendimentos que realizei. Para além disso, antes de passar a ter autonomia no atendimento ao público, de modo a preparar-me para tal, para além de acompanhar os atendimentos de todos os colaboradores, foram-me apresentados diferentes casos práticos pelo meu orientador no *backoffice*, simulando uma situação de atendimento, os quais tinha algum tempo para solucionar. Isto foi essencial para que, sem a pressão de estar ao balcão, ficasse a conhecer melhor os produtos que podia aconselhar, assim

como interiorizar as medidas não farmacológicas a indicar, resultando em futuros atendimentos com maior confiança e segurança.

2.1.3. Equipa

A equipa da Farmácia dos Olivais, apresentada anteriormente, é constituída por colaboradores extremamente profissionais com espírito de entreatajuda e boa disposição, que resulta numa boa dinâmica e organização da equipa, refletindo-se numa relação positiva com o utente.

Como estagiária tenho de ressaltar a excelente integração e acompanhamento que me proporcionaram, o que considerei essencial para uma maior aprendizagem.

2.1.4. Aplicação de conhecimentos adquiridos no plano de estudos do MICF

Com o estágio em FC concluí que esta saída profissional é, indiscutivelmente, aquela para a qual o MICF melhor nos prepara. Unidades curriculares como “Farmacologia”, “Farmacoterapia”, “Farmácia Clínica”, “Indicação Farmacêutica”, “Fitoterapia”, “Dermofarmácia e Cosmética”, “Comunicação e Marketing Farmacêutico” e “Organização e Gestão Farmacêutica”, abordam áreas que considero ter conseguido colocar em prática diariamente ao longo deste estágio. Para além dos conhecimentos base adquiridos ao longo do curso, o sucesso no aconselhamento farmacêutico exige uma formação contínua, para a qual também fui estimulada.

2.1.5. Organização e gestão documental e do espaço físico

As tarefas desempenhadas no quotidiano da FC exigem um grande nível de organização de toda a documentação, nomeadamente de faturas, notas de crédito, notas de encomenda, devoluções, reservas, registo de entrada e saída de psicotrópicos, receitas manuais, entre outros. Na Farmácia dos Olivais esta organização era consideravelmente complexa e rigorosa, mas destaco-a como um ponto forte do estágio pelo facto de ter despoletado em mim uma maior capacidade de organização e responsabilidade.

Relativamente à gestão do espaço físico este deve ser feito de modo a facilitar o processo de dispensa no caso dos Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM), uma vez que não se encontram visíveis ao público e não são alvo de *merchandising*. Na Farmácia dos Olivais estes encontravam-se organizados em gavetas por ordem alfabética de substância ativa. Este tipo de organização no início causou-me alguma dificuldade e lentidão no atendimento, uma vez que a maioria dos utentes conhecem os seus medicamentos pelo nome da marca, questão para a qual o curso não nos prepara devidamente. Porém, posteriormente, traduziu-

se num ponto positivo uma vez que se manifestou num treino necessário para que terminasse o estágio com uma maior preparação relativamente ao conhecimento das marcas dos medicamentos.

Por fim, foi tarefa regular do estágio a organização dos Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) em lineares assim como dos restantes produtos de saúde e de cosmética, atendendo a questões de *merchandising*, conseguindo pôr em prática alguns conceitos abordados ao longo do plano de estudos.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Preparação de manipulados

Apesar da Farmácia dos Olivais apresentar a preparação de manipulados como um serviço disponível com um laboratório devidamente equipado para o seu desempenho, durante o meu período de estágio não houve nenhum pedido para a preparação de nenhum medicamento manipulado. Desta forma, não tive oportunidade de assistir ou realizar a sua preparação. Por conseguinte, não consegui colocar em prática alguns conhecimentos galénicos e tecnológicos fornecidos durante o curso e que considero importantes para a formação de um farmacêutico como especialista do medicamento.

2.2.2. Tempo dispensado em procedimentos relacionados com a testagem à COVID-19

Todo o procedimento que envolvia a testagem à COVID-19, com exceção da realização da recolha da amostra, ocupou grande parte da minha parte inicial do estágio, altura em que a testagem batia recordes diariamente a nível nacional. A Farmácia dos Olivais realizava várias dezenas de testes por dia, o que implicava uma concentração de colaboradores nesta tarefa. Apesar de considerar que foi importante o conhecimento de todos os passos que envolviam a testagem para saber dar resposta às questões apresentadas pelos utentes, de forma global, sinto que o tempo dispensado nesta resultou numa menor experiência em outras atividades quotidianas em FC.

2.2.3. Número de receitas manuais

Apesar do número de receitas manuais já ser bastante reduzido e avistar-se o seu fim, na Farmácia dos Olivais ainda eram apresentados, diariamente, um número considerável de receitas neste formato. Isto deve-se ao facto de ser um estabelecimento com grande afluência de médicos com alguma idade, que faziam a sua autoprescrição ou prescrição a familiares. Este tipo de receitas exige a verificação dos critérios de aceitação obrigatórios onde pode surgir

uma certa dificuldade no processo causado pela pouca legibilidade da escrita. Por este motivo, sentia a necessidade da confirmação por um colaborador mais experiente, de forma a dispensar sempre o medicamento prescrito corretamente.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Formações complementares

A formação contínua é essencial para uma boa execução de qualquer atividade profissional. Para que o farmacêutico faça um aconselhamento terapêutico adequado é necessário atualizar-se e fomentar conhecimentos continuamente, assim como conhecer os produtos disponíveis no estabelecimento.

Durante o período de estágio tive a oportunidade de receber uma formação da Pharma Nord[®] sobre os suplementos alimentares da gama Bioativo, no hotel Tryp Coimbra, encontrando-se o respetivo certificado no Anexo I. Esta realizou-se num período inicial do estágio possibilitando-me fornecer no seu decorrer um melhor aconselhamento destes produtos. Outra formação que tive a oportunidade de realizar presencialmente, no mesmo local, foi da marca Uriage[®] na qual apresentaram os produtos das diferentes gamas com a possibilidade de os experimentar. Algumas das matérias abordadas nesta formação consegui aplicar de forma transversal a outras marcas de dermocosmética, o que considerei fundamental para aumentar o meu conhecimento na área.

Para além disto, rotineiramente, assisti a formações mais curtas fornecidas presencialmente na farmácia pelos delegados médicos de diferentes marcas de MNSRM, assim como de conselheiras de diferentes marcas de cosmética.

2.3.2. Contacto com ambas as versões do sistema informático Sifarma[®]

A Farmácia dos Olivais utiliza a ferramenta de gestão e atendimento Sifarma[®] desenvolvida pela Glintt, indispensável para a realização da maioria das tarefas quotidianas. O módulo de atendimento é um auxiliar fundamental para promover um bom aconselhamento ao utente. Apesar de a nova versão do Sifarma[®] Atendimento já estar instalada, muitas das tarefas desempenhadas no *backoffice* ainda exigem a versão Sifarma[®] 2000. Para além disso, no atendimento consegui utilizar ambas as versões. Relativamente à nova versão, considero que apresenta um formato mais simplificado sendo mais intuitiva no atendimento, contudo ainda apresenta algumas lacunas, o que me fez optar por utilizar com mais frequência a versão mais antiga.

2.3.3. Diversidade de produtos de dermofarmácia e cosmética

A extensa variedade de marcas de cosmética apresentada pela Farmácia dos Olivais trouxe a oportunidade de aumentar os meus conhecimentos nesta área de modo a dar resposta às necessidades dos utentes. As marcas Klorane[®], Dercos[®], Rene Furterer[®], Phyto[®], Vichy[®], Ducray[®], La Roche Posay[®], Avene[®], Cetaphil[®], Bioderma[®], Uriage[®], Lierac[®], Filorga[®], ISDIN[®], Darphin[®], Enecta[®], Caudalie[®] e SVR[®] estão presentes na farmácia.

Apesar da presença da unidade curricular de Dermofarmácia e Cosmética no plano de estudos do MICF, sinto que não nos proporciona os conhecimentos suficientes que esta área exige ao nível da FC. Deste modo, foi essencial o apoio dos diferentes colaboradores nos atendimentos dirigidos para aconselhamento em cosmética. Para além disso, a disponibilidade das conselheiras das diferentes marcas para esclarecer todas as minhas dúvidas, revelou-se importante para fomentar os meus conhecimentos.

2.4. Ameaças

2.4.1. Concorrência com outros locais de venda de MNSRM

A partir do Decreto-Lei n.º 134/2005, os MNSRM passaram a poder ser vendidos ao público fora das farmácias e com um regime de preços livre (5). Isto permite que estes estabelecimentos consigam aplicar preços mais aliciantes competindo com as farmácias. Ao longo do estágio presenciei diversas situações em que o utente abordava a questão do preço.

A meu ver, esta alteração não trouxe qualquer benefício para a saúde dos cidadãos e representou um retrocesso no sistema farmacêutico que se manifesta até aos dias de hoje. Estes locais promovem a automedicação desencadeando um maior uso irracional do medicamento.

2.4.2. Medicamentos esgotados

Uma ameaça constante que notei no decorrer do estágio foi a frequência com que alguns medicamentos ficavam sem *stock* na farmácia. Para tentar contornar esta situação, os colaboradores despendiam de algum tempo para ligar diretamente aos armazenistas, na tentativa de conseguir algumas unidades dos medicamentos em falta. Na maioria das vezes conseguia-se solucionar o problema no prazo de algumas horas dependendo da disponibilidade ao nível do fornecedor, mas, por vezes, havia medicamentos esgotados durante vários dias a nível nacional.

A maioria dos doentes fideliza-se facilmente a determinados laboratórios, principalmente quando se trata de medicamentos para doenças crónicas. No atendimento, quando o medicamento requisitado se encontrava esgotado tentava propor uma alternativa,

apresentando outro laboratório. Nisto senti alguma resistência para a mudança por parte do utente o que dificultou alguns atendimentos. Em outros casos, quando não existe uma alternativa disponível, o acesso limitado aos medicamentos pode resultar diretamente num maior risco para a saúde do utente.

2.4.3. Situação pandémica causada pelo SARS-CoV-2

Nos primeiros meses de 2022, que coincidiu com o meu período de estágio, foi realizada uma testagem em massa à COVID-19 nas FCs. Como a Farmácia dos Olivais era aderente ao serviço e graças ao seu horário de funcionamento alargado, teve uma afluência muito acentuada para este fim.

A testagem nas farmácias foi um pilar fundamental para o combate à pandemia. Por um lado, este serviço foi benéfico em termos económicos porque os utentes aproveitavam para procurar aconselhamento para os sintomas que apresentavam, por outro causou um maior receio no deslocamento à farmácia uma vez que as pessoas a associavam a um local com maior risco de contágio, apesar do cumprimento de todas as medidas de segurança. Estas medidas, nomeadamente a utilização de máscaras e os acrílicos nos balcões de atendimento, apesar de essenciais para o controlo da disseminação do vírus representaram uma barreira à comunicação, resultando numa ameaça para a realização de um aconselhamento adequado com a perceção do utente.

Por este motivo, considero que a situação pandémica representou uma ameaça para o normal funcionamento do estabelecimento e, conseqüentemente, da minha experiência. Contudo possibilitou-me desenvolver uma maior capacidade de resposta a adversidades, importante para o meu futuro profissional.

Casos Práticos

- **Queda de cabelo**

Utente do sexo masculino com cerca de 50 anos queixa-se que o seu cabelo tem vindo a ficar cada vez mais fino notando uma queda progressiva que já começa a ser visível e a afetar a sua autoestima, solicitando uma solução. De modo a descartar situações que encaminharia para o médico, questionei se havia perda de cabelo de formato redondo (alopecia areata) ou se se tratava de uma perda aguda e difusa com causa conhecida recente como infeções, transtornos alimentares ou *stress* emocional extremo (eflúvio telogénico). O utente respondeu que a perda tinha sido gradual, mais localizada e sem ocorrer qualquer mudança no seu estilo de vida que o justificasse. Daqui conclui que estaria perante um caso de alopecia androgenética masculina, verificando que apresentava o padrão comum com uma perda visível na parte

superior do couro cabeludo. Comecei por recomendar a necessidade de passar a utilizar um cosmético capilar adequado para o estado do cabelo e como já apresentava uma alopecia mais avançada indiquei que seria necessário completar com uma loção e suplemento alimentar. Para isso aconselhei a gama de antiqueda Lambdapil® da ISDIN constituída por um champô de utilização diária, uma loção e um suplemento alimentar na forma de cápsulas. O extrato de *Serenoa repens* presente no champô e suplemento é um derivado botânico inibidor da 5alfa-redutase, enzima que converte a testosterona em 5-dihidrotestosterona responsável pela queda de cabelo. Outros constituintes como taurina, L-cistina, biotina, vitamina B3, B5 e B6 contribuem para a estabilização do equilíbrio hormonal essencial para o crescimento do cabelo. Para um tratamento adequado indiquei a utilização diária do champô com uma massagem mais profunda deixando atuar alguns minutos seguido de enxaguamento, a aplicação da loção ao deitar, diariamente, com uma massagem no couro cabeludo seco e a toma de 2 cápsulas por dia ao pequeno-almoço (6). Terminei o atendimento por alertar que para resultados visíveis é essencial não parar o tratamento durante 3 meses.

- **Hemorroidas**

Uma senhora por volta dos 40 anos dirige-se à farmácia solicitando algo para aliviar as hemorroidas. Primeiro comecei por questionar quais os sinais e sintomas que apresentava, há quanto tempo e a existência de doenças concomitantes, assim como da toma de medicamentos. A utente referiu que apresentava uma irritação e ardor na região anal acentuados há 3 dias e acrescentou que era uma situação recorrente assim como a obstipação para a qual tomava laxantes em caso de necessidade. Questionei ainda se tinha observado alguma hemorragia ao qual respondeu negativamente. Posto isto, reforcei a importância das medidas não farmacológicas nesta patologia, nomeadamente a alimentação que deve ser à base de fibras evitando produtos irritantes como álcool, café, picantes, entre outros, assim como hidratos de carbono em demasia, de modo a garantir o bom funcionamento do trânsito intestinal. Estas medidas são igualmente úteis na redução dos períodos de obstipação que apresentava e que podiam promover o aparecimento das hemorroidas. Para além disso, recomendei a realização da limpeza da zona anal de forma suave com banhos de assento com água tépida durante 10 a 15 minutos, 2 a 3 vezes ao dia. Numa situação aguda recomendei lavar com água fria ou aplicar gelo. Evitar estar na sanita muito tempo assim como períodos prolongados na mesma posição fazendo pressão sobre a zona ano-retal e a realização de exercício físico foram medidas complementares que forneci. De seguida aconselhei o creme retal Procto-Glyvenol® que contém tribenosido que apresenta uma ação anti-inflamatória e lidocaína que é um anestésico. Recomendei em fazer a aplicação 2 vezes ao dia depois da

higienização da zona e de preferência depois do ato defecatório de modo a ter uma maior eficácia. Após diminuição dos sintomas agudos recomendei passar a aplicar 1 vez ao dia (7). Uma vez que apresentava recorrências de hemorroidas, de modo a diminuí-las recomendei o tratamento prolongado com um venotrópico que reduz a distensibilidade venosa, o Daflon® 1000 1 vez por dia (8).

- **Tratamento de acne com isotretinoína**

Uma jovem do sexo feminino vem à farmácia levantar a sua receita de isotretinoína, retinóide oral para tratamento da acne grave. No momento da cedência do fármaco alertei para os vários efeitos secundários que este apresenta, nomeadamente a secura das mucosas e da pele que pode desencadear escamação e retração. Para além disso alertei que é um medicamento que causa fotossensibilidade, tornando a pele mais vulnerável ao sol. De modo a colmatar estes efeitos adversos aconselhei utilizar um creme hidratante mais nutritivo assim como um bálsamo de lábios reparador, apresentando o Bioderma Sébium ISOKIT que contém os produtos Sébium Hydra (creme hidratante para pele com tendência acneica temporariamente seca e fragilizada) e Atoderm Bálsamo Labial. Para além disso referi que depois de colocar o creme hidratante de manhã deveria utilizar sempre um protetor solar com fator de proteção 50+, o qual a utente referiu já ter em casa. Como cuidado complementar sugeri a água termal da Uriage® para suavizar a pele num momento de maior necessidade.

- **Sintomas associados a constipação**

Idoso do sexo masculino vai à farmácia para realizar o TRAG de deteção à COVID-19 uma vez que apresenta alguns sintomas respiratórios. Decide esperar pelo resultado do teste verificando que é negativo e aproveita para levar alguma coisa para aliviar os seus sintomas. Pedi para me fazer a caracterização destes, ao que responde que apenas sente o nariz muito entupido e a pingar e uma dor de cabeça ligeira há 2 dias, mas que decidiu fazer o teste para despistar, apesar de não ter tido nenhum contacto com um caso confirmado. Questionei ainda se já tinha tomado algum medicamento para alívio dos sintomas ao que responde que não. Quando questionei à cerca de outra medicação que tomava, uma vez que já aparentava ter uma idade avançada, respondeu que apenas tomava o medicamento para a hipertensão arterial. Posto isto, decidi dispensar um descongestionante nasal tópico por ser mais seguro que o oral, apresentando o Vibrocil® em *spray* com descongestionante (fenilefrina) para promover o alívio do nariz entupido e anti-histamínico (maleato de dimetindeno) para atuar na rinorreia. Expliquei para fazer 1 a 2 nebulizações em cada narina 3 vezes ao dia (9). Para o alívio da dor

de cabeça sugeri a toma de paracetamol 500 mg de 8 em 8 horas. Para além disto, indiquei ser essencial a lavagem nasal com soro fisiológico ou solução salina, antes de utilizar o Vibrocil[®], sugerindo o Rhinomer[®] Força Média que apresenta sob a forma de *spray* água do mar isotónica e estéril (10). Terminei o atendimento por explicar a importância da ingestão de líquidos, de humidificar o ambiente e de ficar em casa em repouso.

- **Diarreia aguda**

Utente do sexo feminino vem à farmácia solicitar algo para a diarreia do seu filho de 4 anos. Após as minhas questões, a utente indica que a diarreia começou no dia anterior, tendo tido mais de 6 dejeções líquidas, com uma dor de barriga constante e que para além disso já tinha vomitado várias vezes durante a noite. Posto isto conclui que podíamos estar perante um quadro inicial de desidratação atendendo à severidade da doença e pelo facto de ser uma criança. Completou que, antes de vir à farmácia, tinha medido a temperatura corporal que estava nos 38,7°C e que tem vindo a aumentar desde ontem. Isto pode ser indicativo de uma diarreia aguda infecciosa e atendendo à gravidade poderia não ser autolimitada. Por este motivo decidi encaminhá-lo para o médico o mais depressa possível.

Conclusão

O MICEF apresenta um vasto plano de estudos que nos fornece os alicerces necessários para uma elevada competência nas diversas saídas profissionais. Sendo a componente teórica a base para um bom desempenho, a prática é essencial para aplicar e consolidar os conhecimentos. Assim, o estágio é fundamental para uma maior aproximação ao mercado de trabalho e preparação para o futuro profissional.

O estágio em FC é logicamente obrigatório sendo esta a área com maior representatividade de farmacêuticos que desempenham um papel fundamental na proteção da saúde do utente. Mais do que um profissional do medicamento, os utentes veem no farmacêutico um profissional de saúde no qual depositam total confiança e recorrem como primeira instância graças à proximidade que apresentam. Cabe-nos a nós continuar a manter este papel, promovendo sempre novos serviços com o objetivo de valorizar a profissão.

A equipa da Farmácia dos Olivais proporcionou-me um estágio curricular onde pude desempenhar praticamente todas as tarefas do quotidiano da farmácia, resultando numa preparação completa que me deixa encorajada para o futuro nesta área. Desta experiência marcante concluí que o companheirismo e entretajuda são a chave para o sucesso e para o bom desempenho da atividade profissional.

Bibliografia

1. UNIVERSIDADE DE COIMBRA – **Unidade Curricular / Estágio Curricular.** [Consultado a 9 de abril de 2022]. Disponível em: https://apps.uc.pt/courses/PT/unit/86966/21781/2022-2023?common_core=true&type=ram&id=1172
2. PITA, João Rui; BELL, Victoria - **A farmácia em Portugal nos últimos 30 anos. Algumas reflexões sobre a farmácia de oficina ou comunitária.** Debater a Europa. ISSN 1647-6336. 15 (2016) 197–215.
3. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **A farmácia comunitária.** [Consultado a 9 de abril de 2022]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>
4. Deliberação n° 1502/2014. D.R. 2ªSérie. N°145 (30 de julho de 2014) 19445
5. Decreto-Lei n° 134/2005. D.R. Série I-A. N°156/2005 (16 de agosto de 2005) 4763-4765
6. ISDIN – **Lambdapil® antiqueda.** [Consultado a 19 de abril de 2022]. Disponível em: <https://www.isdin.com/pt-PT/cuidado-do-cabelo/lambdapil-antiqueda-para-queda-cabelo/>
7. INFARMED, I.P. – **Procto-Glyvenol® 50mg/g + 20 mg/g, creme rectal – Resumo das Características do Medicamento.** [Consultado a 19 de abril de 2022]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
8. INFARMED, I.P. – **Daflon® 1000, 1000mg comprimido revestido por película – Resumo das Características do Medicamento.** [Consultado a 19 de abril de 2022]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
9. VIBROCIL – **Spray Nasal Descongestionante com ação anti-histamínica.** [Consultado a 20 de abril de 2022]. Disponível em: <https://www.vibrocil.pt/produtos-vibrocil/vibrocil-nebulizador.html>
10. RHINOMER – **Rhinomer Força 2.** [Consultado a 20 de abril de 2022]. Disponível em: <https://www.rhinomer.pt/produtos/rhinomer-forca-2.html>

Anexo

- **Anexo I** – Certificado da Formação da Pharma Nord® sobre os suplementos alimentares da gama Bioativo



PARTE II

Relatório de estágio no INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

Direção de Gestão do Risco de Medicamentos (DGRM)



Sob orientação da Dra. Márcia Silva

Lista de Abreviaturas

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

ATC – Anatómica, Terapêutica e Química

DCI – Denominação Comum Internacional

DGRM – Direção de Gestão do Risco de Medicamentos

DHPC – Comunicações Dirigidas aos Profissionais de Saúde

DME – *Designated Medical Event*

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

MedDRA – Dicionário Médico para Atividades Regulamentares

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MMR – Medidas de Minimização do Risco

PASS – Estudos de Segurança Pós-Autorização

PGR – Planos de Gestão de Risco

PRAC – Comité de Avaliação do Risco em Farmacovigilância

PSUR – Relatórios Periódicos de Segurança

PT – *preferred term*

RAM – Reações Adversas a Medicamentos

RCM – Resumo das Características do Medicamento

SNF – Sistema Nacional de Farmacovigilância

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

TAIM – Titular de Autorização de Introdução no Mercado

URF – Unidades Regionais de Farmacovigilância

Introdução

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) engloba uma componente de estágio curricular no vasto plano de estudos que apresenta. Para além da obrigatoriedade de realização de um estágio em Farmácia Comunitária, é oferecida a possibilidade de concretizar um estágio suplementar em outras diversas áreas relevantes do medicamento (1).

Motivada pela curiosidade suscitada na unidade curricular de “Farmacovigilância e Farmacoepidemiologia” do 1º semestre do 5º ano, optei por realizar o meu segundo estágio nesta área. Havendo a possibilidade de realizar um estágio em algumas das direções da Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde – INFARMED, I.P., nomeadamente na Direção de Gestão do Risco de Medicamentos (DGRM), decidi aproveitar a oportunidade de presenciar e desempenhar tarefas dentro da área que me despertou interesse, na instituição que regula o medicamento em Portugal.

Assim sendo, no período de 2 de maio a 29 de julho de 2022 integrei a equipa da DGRM, sob a orientação da Diretora de Direção, Dra. Márcia Silva, e colaboração dos restantes membros. Durante estes três meses, após o período de formação, desempenhei diferentes tarefas que me permitiram compreender o conjunto de atividades necessárias para monitorização da segurança contínua do medicamento, após o início da sua comercialização.

No presente relatório irei fazer uma avaliação crítica do período de estágio, sob a forma de análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), iniciando com um enquadramento do INFARMED, I.P. e respetiva DGRM e terminando com uma opinião global desta experiência profissional.

I. O INFARMED, I.P. e a DGRM

Em 1993 foi criado o Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento – INFARMED que passou a designar-se de Autoridade Nacional em 2006 (2).

O Infarmed é um instituto público dotado de autonomia administrativa, financeira e património próprio, integrado na administração indireta do estado, que tem por missão regular os diferentes setores dos medicamentos de uso humano e dos produtos de saúde garantindo a sua eficácia, qualidade e segurança, tal como o seu acesso aos profissionais de saúde e cidadãos. Apresenta sede em Lisboa e encontra-se organizado em 5 órgãos: o conselho diretivo constituído por um presidente, um vice-presidente e um vogal; o fiscal único; o conselho consultivo; as comissões técnicas especializadas; e o Conselho Nacional de Publicidade de Medicamentos e Produtos de Saúde (3). As unidades orgânicas dividem-se em

funções de negócio/áreas de atribuição, onde se integra a DGRM, e funções de suporte/ áreas de gestão, como se pode ver esquematizado no organograma, disponível no Anexo I (4).

À DGRM compete assegurar a coordenação do Sistema Nacional de Farmacovigilância (SNF) e das 10 unidades regionais de farmacovigilância (URF) que o integram, gerir o sistema de alertas de farmacovigilância da União Europeia, assegurar a monitorização da segurança dos medicamentos através dos Planos de Gestão de Risco (PGR), realizar estudos epidemiológicos e colaborar com outras entidades na promoção destes estudos, assegurar a divulgação de informações de segurança para profissionais de saúde e utentes, colaborar em atividades e estabelecer articulações com outros em matéria de farmacovigilância e assegurar a representação do Infarmed, no âmbito das suas atribuições, nomeadamente no Comité de Avaliação do Risco em Farmacovigilância (PRAC) (5).

Esta direção está dividida em duas equipas com diferentes funções, mas que se encontram interligadas, a equipa de Gestão do SNF e Gestão do Sinal e a Equipa de Gestão do Risco e Implementação de Medidas de Minimização do Risco (MMR).

A equipa de Gestão do SNF e Gestão do Sinal é responsável pela receção e análise de notificações de suspeitas de Reações Adversas a Medicamentos (RAM). As URF são as responsáveis pelo processamento das notificações provenientes das regiões que lhe estão alocadas, e cada uma tem um interlocutor da DGRM dentro desta equipa, responsável por gerir este processamento. Ao nível do Portal RAM, que representa o portal de notificação de suspeitas de RAM do SNF, são tarefas diárias a verificação de duplicados (o mesmo caso notificado mais do que uma vez de uma forma diferente) e inserção de campos de preenchimento manual como o carregamento da Denominação Comum Internacional (DCI) de cada medicamento suspeito de causar a RAM, assim como do grupo da classificação Anatómica, Terapêutica e Química (ATC) a que pertence. Para além disso, esta equipa é ainda responsável por submeter notificações no Portal RAM, quando estas chegam via *e-mail* ou telefone. Para isso, é necessário codificar as RAM notificadas nos respetivos termos do dicionário médico para atividades regulamentares (MedDRA), que representa a terminologia médica internacional standardizada. A deteção e gestão de sinais de segurança que contribui para identificar novos riscos associados aos medicamentos e atualizar o seu perfil de segurança são, igualmente, da responsabilidade desta equipa. Por último, a elaboração de circulares informativas tal como as notas informativas também se encontram a cargo desta.

A equipa de Gestão do Risco e Implementação de MMR é responsável pela gestão e avaliação de PGR, de Relatórios Periódicos de Segurança (PSUR) e de Estudos de Segurança Pós-Autorização (PASS). É, ainda, responsável pela concordância com materiais educacionais,

validação de comunicações dirigidas aos profissionais de saúde (DHPC) e representação do Infarmed no PRAC.

A elaboração do boletim de farmacovigilância, publicação com informação sobre efeitos adversos dos medicamentos que se destina a profissionais de saúde, é da responsabilidade de toda a DGRM (6). Para além disso, o reforço da componente de investigação em farmacovigilância é uma atividade transversal desta direção, para a qual me foi possível contribuir através do desenvolvimento de um trabalho de investigação que permitiu analisar o perfil de notificações de RAM registadas no EudraVigilance (sistema de gestão e análise das informações sobre suspeitas de RAM de medicamentos autorizados no Espaço Económico Europeu) dos fármacos inibidores da neuraminidase.

2. Análise SWOT

A apreciação global do estágio irá seguir o modelo SWOT que consiste em identificar a nível interno os pontos fortes (*Strengths*) e os pontos fracos (*Weaknesses*) e a nível externo as oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*) que notei no decorrer do estágio.

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Plano de formação inicial

O estágio iniciou-se com uma componente teórica bastante robusta, em que cada formador abordou a área na qual desempenha tarefas no quotidiano. Senti que o plano de formação inicial estabeleceu as bases necessárias para desenvolver na prática as tarefas que me foram propostas ao longo do estágio, em ambas as equipas que constituem a DGRM. Por outro lado, considero que caso todas as formações tivessem sido num período mais inicial teria sido mais vantajoso, uma vez que certos conceitos necessários para determinadas tarefas, apenas nos foram apresentados ao fim de várias semanas, o que atrasou o meu processo de autonomia.

2.1.2. Diversidade das tarefas desempenhadas

Apesar de ter sido alocada, inicialmente, à equipa de gestão do SNF e gestão do sinal, tive a oportunidade de realizar diversas tarefas de ambas as equipas, sempre com o apoio e supervisão dos colaboradores, o que se manifestou num dos grandes pontos positivos do meu estágio.

Na equipa de gestão do SNF e gestão do sinal iniciei por me familiarizar com os variados campos do Portal RAM, plataforma que representa a base de trabalho desta equipa. Após as diversas formações do portal, fui ganhando autonomia na deteção de duplicados,

carregamento de DCIs e ATCs e na introdução de casos que chegavam por via indireta, onde fiz a codificação das RAM para os respetivos termos do dicionário MedDRA. Esta codificação permitiu aumentar o meu conhecimento relativamente a termos técnico-científicos específicos, tanto na língua portuguesa como inglesa. Para além disso, foi-me permitido elaborar os relatórios de monitorização da unidade de Coimbra relativo ao mês de abril e o da unidade de Guimarães relativo ao mês de maio, de modo a gerir o processamento dos casos realizado por estas unidades.

Na equipa de gestão do risco e implementação de MMR, as minhas tarefas concentraram-se, essencialmente, na revisão dos materiais educacionais e DHPC. Fiquei responsável por avaliar os materiais educacionais de dois medicamentos, aquando do pedido para sua atualização por parte do Titular de Autorização de Introdução no Mercado (TAIM). Para isso, consultava procedimentos operacionais e instruções de trabalho pré-definidos, que foram uma ferramenta fundamental de auxílio para desempenho da tarefa. Porém, foi sempre imprescindível dar uso ao meu sentido crítico e capacidade de deteção de falhas o que exigia uma grande concentração no momento da validação e avaliação. Foi, ainda, possível acompanhar a validação de uma DHPC até à sua publicação na INFOMED, base de dados de medicamentos de uso humano.

Como desempenhei tarefas em ambas as equipas concomitantemente, para as quais tinha prazos a cumprir, exigiu da minha parte uma grande capacidade de organização e de priorização de atividades.

Na parte final do estágio foquei-me no trabalho de investigação com o apoio de alguns colaboradores da DGRM. Este permitiu-me desenvolver *skills* de pesquisa em diferentes motores de busca e de tratamento de dados nomeadamente em Microsoft Excel e, como em qualquer trabalho de investigação, dar uso, uma vez mais, ao meu espírito crítico.

2.1.3. Aplicação dos conhecimentos adquiridos nas unidades curriculares

O plano de estudos do MICF na FFUC, ao longo dos 5 anos de curso, proporciona uma grande abrangência teórica na área das ciências farmacêuticas, mas também na área das ciências biológicas e biomédicas e na área das ciências físico-químicas. Deste modo, sinto que o curso nos oferece os conhecimentos necessários para colocar em prática nos estágios curriculares e no futuro profissional.

Ao longo do meu estágio na DGRM deparei-me com conceitos abordados em diferentes unidades curriculares, com os quais já me encontrava familiarizada, o que permitiu uma maior facilidade de compreensão das tarefas desenvolvidas. Destaco as unidades curriculares de Farmacoterapia e as diferentes Farmacologias onde nos foi incentivada a

utilização da INFOMED para consulta, essencialmente, do resumo das características do medicamento (RCM) na resolução de casos clínicos. Esta preparação efetuada ao longo do curso manifestou-se numa mais-valia no desempenho de diversas tarefas durante o estágio. A unidade curricular de Farmacovigilância e Farmacoepidemiologia merece ainda mais destaque, nomeadamente a parte da Farmacovigilância, que é lecionada de forma extremamente completa e que a partir do estágio concluí ser essencial para quem pretende seguir esta área.

2.1.4. Equipa

Um bom ambiente de trabalho é essencial para uma experiência positiva. Na DGRM contactei com uma equipa, maioritariamente, de farmacêuticos, com diferentes percursos, mas todos eles excelentes profissionais que se mostraram sempre dispostos a ajudar e orientar as minhas atividades. Desde o primeiro dia senti-me integrada na equipa o que facilitou a comunicação com os diferentes membros e aumentou a confiança para expor qualquer dúvida ou sugestão.

2.1.5. Sistema de Gestão da Qualidade

A política da qualidade do Infarmed traduz-se numa atuação em 4 vertentes: valor – regulação com impacto positivo; participação – mais participação de clientes parceiros; agilidade – promover a agilidade organizacional; e cultura – melhorar a experiência do colaborador (7).

Desde 2009, as atividades da DGRM encontram-se organizadas em 2 processos certificados segundo a Norma NP EN ISO 9001:2015, de modo a garantir uma maior qualidade na execução de procedimentos operacionais de farmacovigilância. Estes procedimentos tornaram-se uma mais-valia no meu quotidiano do estágio, essencialmente na avaliação dos materiais educacionais.

Os processos e instruções de trabalho são adaptados permanentemente às necessidades atuais, de modo a estimular uma melhoria contínua (7).

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Falha das plataformas e aparelhos eletrónicos

Todo o trabalho desenvolvido na DGRM está dependente do funcionamento das plataformas eletrónicas que se utilizam diariamente, nomeadamente o *outlook* e o Portal RAM. No decorrer do estágio notei alguma falha destas plataformas que condicionou o trabalho de todos os colaboradores. Relativamente ao EudraVigilance, a extração de listagens de casos de

RAM demonstrou-se um processo moroso, traduzindo-se, por este motivo, numa plataforma com algumas lacunas.

Tal como acontece com outras grandes instituições, a ferramenta Microsoft Excel é muito utilizada dentro da DGRM. Como até ao momento do estágio não tinha desenvolvido aptidões nesta ferramenta, a sua utilização manifestou-se um desafio. O facto de trabalhar com grandes bases de dados, nomeadamente, no trabalho de investigação desenvolvido, aumentou a dificuldade da sua utilização e conseqüente tratamento dos dados.

Para além disso, os aparelhos eletrónicos que foram fornecidos no início do estágio apresentaram dificuldades de funcionamento com o aumento da sua utilização. Isto revelou-se um ponto negativo do meu estágio na medida em que me causava alguma dificuldade na realização de determinadas tarefas.

2.2.2. Ausência de sessão de boas-vindas e de interação com outras direções do Infarmed

Ao contrário do que aconteceu em outros anos, a sessão de boas-vindas que inicialmente tinha sido adiada, não se realizou. Isto fez com que determinadas informações não fossem fornecidas inicialmente, tais como o funcionamento interno e a divisão das instalações e setores do Infarmed. Para além disso, a ausência de contacto com outras direções durante o estágio dificultou a minha visão geral do Infarmed como instituição, tendo-se revelado um ponto fraco da minha experiência. Todavia, a equipa da DGRM fez uma integração adequada dos estagiários e conseguiu dar resposta a qualquer questão apresentada sobre o funcionamento da autoridade nacional.

2.2.3. Falta de recursos humanos

Havendo a necessidade de confirmação por parte de um colaborador das atividades por mim desenvolvidas, e devido à falta de recursos humanos para a quantidade de trabalho existente, por vezes via a conclusão do meu trabalho adiada pela impossibilidade da sua verificação. Isto revelou-se um ponto fraco, nomeadamente, nas situações da necessidade de cumprimento de prazos. Porém, compreendo que os colaboradores não poderiam abdicar das suas tarefas e funções diárias, ficando a supervisão para segundo plano.

2.2.4. Duração do estágio

Apesar de ter desempenhado diferentes funções ao longo destes 3 meses, senti que a duração do estágio se manifestou insuficiente, uma vez que não foi possível finalizar determinados processos e atividades. A avaliação dos materiais educacionais pode tornar-se

uma atividade demorada dependendo das alterações necessárias, do tempo de resposta do TAIM e de quando é obtida a concordância. Apesar de ter concluído a avaliação dos materiais que me foram atribuídos, não consegui acompanhar o processo até ao momento final da publicação na INFOMED. Para além disto, o trabalho de investigação que iniciei numa altura mais tardia do estágio, pelo facto do fim se estar a aproximar, manifestou-se num aumento considerável da carga de trabalho nas últimas semanas. Com uma duração de estágio superior seria possível evitar estes pontos negativos.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Formações e palestras proporcionadas

Para além da cedência de vários documentos base para o desempenho de tarefas em farmacovigilância e das formações fornecidas pelos colaboradores, foi oferecida a possibilidade de realizar, via *online*, cursos certificados promovidos por diferentes entidades. Estes permitiram relembrar alguns conceitos e abordar outros novos que representaram uma base teórica essencial no decorrer do estágio. Realizei os cursos “*Introduction to pharmacovigilance*” promovido pela *Uppsala Monitoring Centre*, “*SCOPE- Signal Management*” promovido pela *EMA EU network training centre* e “*Real-world evidence*” promovido pela *EASD (European Association for the Study of Diabetes)*. Os respetivos certificados encontram-se nos Anexos 2, 3 e 4.

Periodicamente, o Infarmed organiza Manhãs Informativas que tem como destinatários os utilizadores dos seus serviços, assim como os próprios colaboradores. Tive oportunidade de assistir a duas das três manhãs informativas que se realizaram durante o meu período de estágio, com os temas “*Utilização de dados em saúde no apoio à decisão*” e “*Farmacovigilância*”. Relevo a importância desta última, organizada pela DGRM, em que foi abordada a implementação da ICH E2B (R3) pelos sistemas de farmacovigilância e a mudança que traz na forma de comunicação dos casos de RAM. Foi apresentada a nova estrutura do Portal RAM resultado desta implementação e aproveitou-se para abordar a importância da notificação e da qualidade da informação para avaliação da segurança dos medicamentos.

2.3.2. Desenvolvimento de competências a nível informático

Como referi anteriormente, a DGRM utiliza diariamente diversas plataformas e sistemas informáticos das quais depende para realizar o seu trabalho. Apesar de inicialmente considerar que um dos meus pontos fracos seriam as minhas aptidões informáticas, o desenvolvimento destas competências revelou-se uma das maiores oportunidades que o estágio me proporcionou. Dou destaque à plataforma Microsoft Excel que utilizei em várias tarefas quotidianas e onde fui descobrindo diferentes funcionalidades que desconhecia.

O Infarmed apresenta uma rede interna designada de Intranet onde a partir desta se consegue aceder às diferentes plataformas e processos necessários para o desempenho de tarefas e, ainda, onde se reporta os erros técnicos e se pede suporte à equipa informática. Para além da utilização diária desta rede, também o *outlook* fez parte do meu quotidiano, uma vez que representou a ferramenta de comunicação interna e externa.

Tudo isto me possibilitou desenvolver competências a nível informático que considero que se vão manifestar como uma mais-valia no meu futuro profissional.

2.3.3. Desenvolvimento de um trabalho de investigação

Pelo facto de termos acesso a base de dados, tanto nacionais como globais, de notificações de RAM, e sendo uma das missões da DGRM o aumento da investigação em farmacovigilância, foi-me oferecida a possibilidade de realizar um trabalho sobre um tema à minha escolha. Optei por desenvolver um trabalho que analisa o perfil de notificações de RAM apresentados pelos inibidores da neuraminidase, notificadas na plataforma EudraVigilance. A escolha do tema baseou-se no facto de representar uma oportunidade de complementar conhecimentos à cerca da gripe, doença infecciosa que abordo na minha monografia. A curiosidade em avaliar como a resistência a estes fármacos afeta o perfil de notificações foi, igualmente, um dos fatores de escolha. No trabalho são estudadas as variáveis: evolução temporal, questões geográficas e gravidade das notificações; sexo e faixa etária do doente; e a reação *preferred term* (PT) e os termos *Designated Medical Event* (DME) das RAMs.

2.3.4. Comunicação com os Stakeholders

O Infarmed representa a autoridade nacional do medicamento e por este motivo necessita de estar em contacto permanente com os diferentes intervenientes da cadeia do medicamento, desde a indústria farmacêutica aos profissionais de saúde. Na DGRM, tive a oportunidade de estabelecer contacto com profissionais de farmacovigilância presentes nas indústrias farmacêuticas e nas URF, de modo a melhorar o acompanhamento da monitorização da segurança dos medicamentos. A tarefa de avaliação de materiais educacionais permitiu-me uma maior proximidade com o TAIM o que considerei uma oportunidade que melhorou, sobretudo, a minha eloquência na escrita pela necessidade de formalidade nos *e-mail* partilhados.

2.3.5. Mudança de R2 para R3 do ICH E2B com alterações ao nível do Portal RAM

A implementação da revisão 3 do ICH E2B, obrigatória até 30 de junho de 2022, teve alterações ao nível do Portal RAM, nomeadamente, o aumento de campos de preenchimento

obrigatório, a introdução dos valores nulos (*NullFlavor*), a possibilidade de realizar emendas, a passagem de classificação da gravidade por caso para classificação por RAM, entre outras. Estas alterações representam uma oportunidade para melhorar a qualidade das notificações que chegam para tratamento e, conseqüentemente, melhorar a avaliação da segurança dos medicamentos.

2.4. Ameaças

2.4.1. Quantidade e qualidade das notificações de RAM

Apesar das diversas sessões de formação que a DGRM proporciona de modo a sensibilizar para a notificação de RAM, o seu baixo número continua a ser uma ameaça para a adequada monitorização da segurança do medicamento, após o início da sua comercialização.

O desconhecimento generalizado da população sobre a existência do sistema de notificação, concentra as notificações nos profissionais de saúde que contactam diretamente com o medicamento. A sensibilização direcionada para os utentes será um trabalho futuro necessário para solucionar este problema.

Para além disso, a qualidade das notificações que chegam via Portal RAM é um aspeto importante que ainda necessita de ser melhorado, uma vez que continuamos a presenciar determinados erros de processamento.

2.4.2. Funcionamento das URF

Relacionado com o descrito no tópico anterior, encontra-se o funcionamento das URF. Estas são as responsáveis pelo processamento dos casos que chegam das zonas territoriais que lhe estão alocadas. Durante a elaboração dos relatórios mensais de monitorização notei que eram poucos os casos processados no período avaliado e alguns deles apresentavam erros de processamento. A limitação de recursos humanos, nomeadamente de profissionais qualificados, em algumas das URF, pode representar uma ameaça ao bom funcionamento do SNF.

Conclusão

Nenhum medicamento é livre de reações adversas, porém a deteção destas encontra-se limitada numa fase pré-comercialização pelo facto de representar um ambiente controlado com dados de exposição concretos. Por outro lado, após o início da comercialização temos uma utilização prolongada com exposição de subpopulações e utilização fora da Autorização de Introdução no Mercado (AIM), o que possibilita a deteção de RAM raras ou tardias. Para que seja possível o conhecimento destas, é essencial a sua notificação, sendo a qualidade da

informação a chave essencial para uma monitorização adequada. Com a identificação dos problemas de segurança e conseqüente comunicação aos profissionais de saúde e população em geral, minimiza-se o risco associado à toma do medicamento.

Sendo o farmacêutico o especialista do medicamento cabe-lhe contribuir para a evolução da farmacovigilância com conseqüente aumento da proteção da saúde pública. O estágio na DGRM, para além de me ter familiarizado com todos estes conceitos, alertou-me para a importância de ser uma farmacêutica com papel ativo na farmacovigilância dando-me as bases necessárias para que este papel seja desempenhado com sucesso.

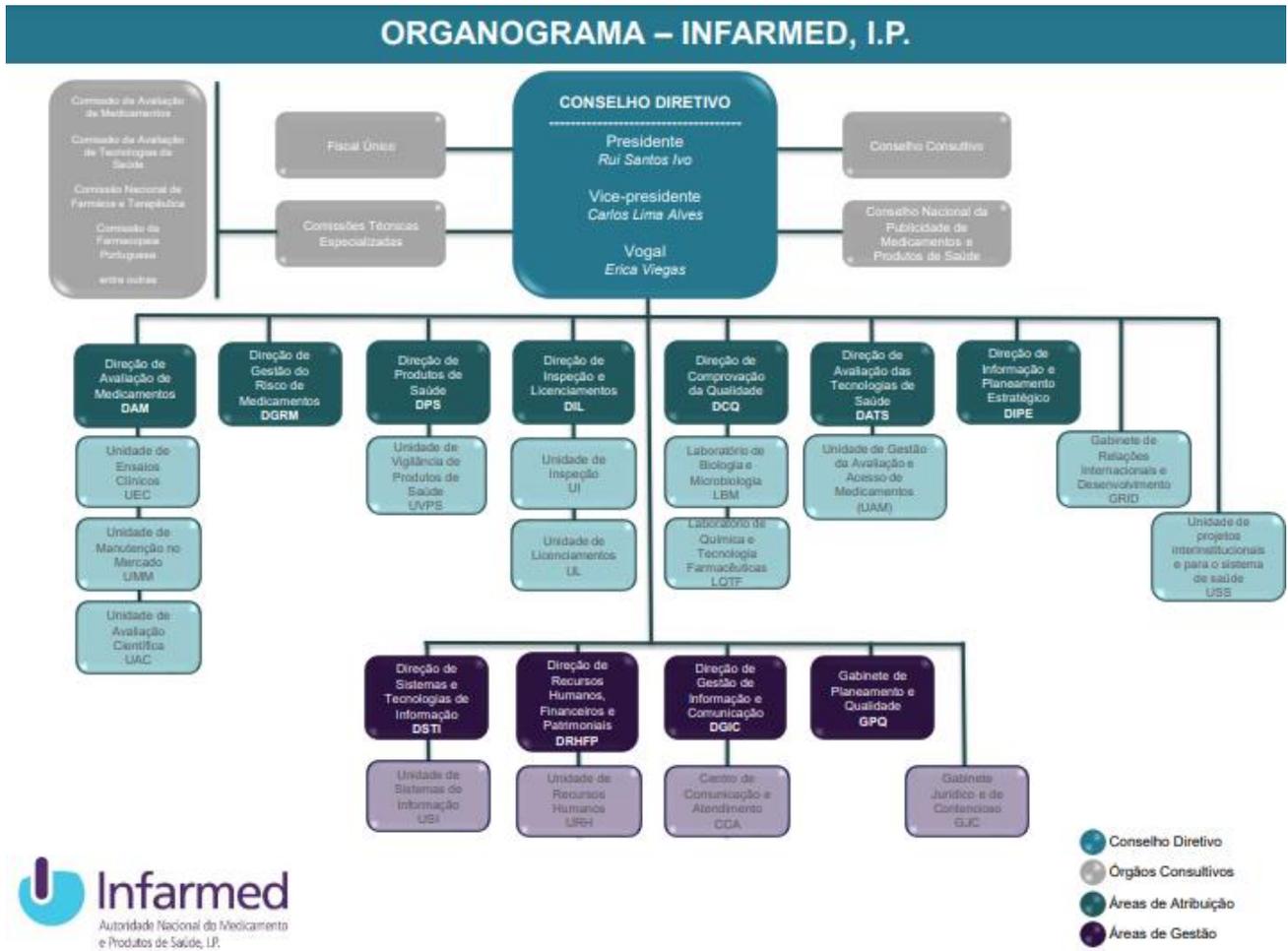
Por fim, considero que esta tenha sido uma experiência extremamente enriquecedora e desafiadora, que despoletou em mim capacidades que irei aplicar no meu futuro profissional com uma maior segurança e sentido de responsabilidade.

Bibliografia

1. UNIVERSIDADE DE COIMBRA – **Unidade Curricular / Estágio Curricular**. [Consultado a 12 de junho de 2022]. Disponível em: https://apps.uc.pt/courses/PT/unit/86966/21781/2022-2023?common_core=true&type=ram&id=1172
2. INFARMED – **Cronologia**. [Consultado a 12 de junho de 2022]. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/cronologia>
3. Decreto-Lei n.º 46/2012. D.R. 1ª Série. N.º 40 (24 de fevereiro de 2012) 884-890.
4. INFARMED – **Organograma**. [Consultado a 12 de junho de 2022]. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/1269448/Organograma/f2d3a25c-1d5b-94f1-da67-fe4e36c1fb26>
5. Portaria n.º 267/2012. D.R. 1ª Série. N.º 169 (31 de agosto de 2012) 4980-4986.
6. INFARMED – **Boletim de Farmacovigilância**. [Consultado a 15 de junho de 2022]. Disponível em: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/documentacao_e_informacao/publicacoes/tematicos/boletim-de-farmacovigilancia
7. INFARMED – **Política da Qualidade**. [Consultado a 20 de junho de 2022]. Disponível em: https://www.infarmed.pt/documents/15786/1269453/Politica_Qualidade20090415_0.pdf/7baaf7f5-b30d-48d9-a293-0f680f4f4169

Anexos

- **Anexo I** – Organograma do Infarmed



- **Anexo 2** – Certificado do curso “Introduction to pharmacovigilance” promovido pela *Uppsala Monitoring Centre*

CERTIFICATE OF COMPLETION



We hereby certify that

Diana Abreu

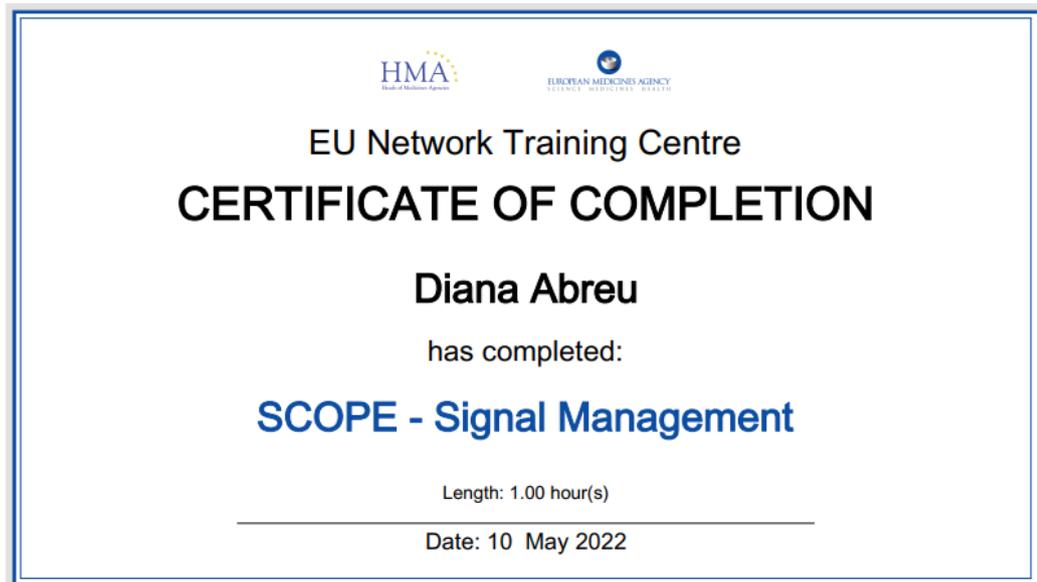
has successfully completed

Introduction to pharmacovigilance

Date:
05/05/2022



- **Anexo 3** – Certificado do curso “SCOPE- Signal Management” promovido pela EMA EU network training centre



- **Anexo 4** – Certificado do curso “Real-world evidence” promovido pela EASD



Parte III

Monografia

“Vacinas de mRNA: uma nova geração de vacinas para a gripe”

Sob orientação da Professora Doutora Olga Maria Fernandes Borges Ribeiro

Lista de Abreviaturas

(-)ssRNA – RNA de cadeia simples e polaridade negativa

ImΨ – NI-metil-pseudouridina

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

DNA – ácido desoxirribonucleico

DSPC – distearoil-fosfatidilcolina

dsRNA – RNA de cadeia dupla

ECDC – *European Centre for Disease Prevention and Control*

EMA – Agência Europeia do Medicamento

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration*

GISAID – *Global Initiative for Sharing All Influenza Data*

GISRS – *Global Influenza Surveillance and Response System*

GSK – GlaxoSmithKline

HA – hemaglutinina

IFN – interferão

im – intramuscular

I-MOVE – *Influenza - Monitoring Vaccine Effectiveness*

LNP – nanopartícula lipídica

M1 – proteína da matriz M1

M2 – proteína de canal iónico M2

m5C – 5-metilcitidina

m5U – 5-metiluridina

m6A – N6-metiladenosina

mRNA – RNA mensageiro

NA – neuraminidase

NP – nucleoproteína

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORF – região traduzível

PAMP – padrão molecular associado a patogénios

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

PEG – polietilenoglicol

PEI – polietilenoimina

PRR – recetor de reconhecimento de padrão

rHA – Hemaglutinina recombinante

RNA – ácido ribonucleico

RSV – vírus sincicial respiratório

s2U – 2-tiouridina

sa-mRNA – mRNA auto-replicante

SARS CoV-2 – síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2

sc – subcutânea

slgA – imunoglobulina A secretora

siRNA – *small interfering RNA*

TLR – recetor do tipo *Toll*

U – Uridina

UTR – região não traduzida

vRNP – ribonucleoproteína viral

Ψ – pseudouridina

Resumo

O vírus influenza, capaz de causar epidemias e pandemias de gripe, representa uma ameaça constante à saúde da população. Respostas ao nível da prevenção da sua disseminação, sendo o caso da vacinação, levam já vários anos de implementação. Contudo, as vacinas atualmente disponíveis apresentam um método de produção com algumas limitações, resultando num esforço muito grande, por parte da indústria em colocar no mercado as doses necessárias. Em particular, este aspeto, torna-se ainda mais relevante quando ocorrem pandemias, como aconteceu em 2009. A produção de vacinas de mRNA apresentam-se como uma alternativa promissora. É um processo industrial mais rápido, flexível, e seguro resultando numa produção com elevado rendimento. Sob o ponto de vista da eficácia destas vacinas foram adotadas estratégias, essencialmente ao nível da formulação, com vista a obter a adequada ativação do sistema imunitário inato e assim uma melhor resposta à vacina. Resultados pré-clínicos demonstraram que as vacinas baseadas em mRNA não replicante, convencional, e em mRNA auto-replicante são eficazes na proteção contra o vírus influenza. Este facto, em conjunto com a recente introdução no mercado de vacinas baseadas em mRNA para a COVID-19, permitiu o avanço para ensaios clínicos. Existem ainda desafios a superar com esta nova tecnologia, nomeadamente a avaliação da segurança, porém os resultados clínicos preliminares sugerem que esta plataforma poderá ser uma boa alternativa às atuais disponíveis, representando uma nova geração de vacinas para a gripe.

Palavras-chave: vírus influenza; vacina para a gripe; vacina de mRNA; mRNA auto-replicante; ensaio clínico.

Abstract

The influenza virus, capable of causing influenza epidemics and pandemics, represents a constant threat to the health of the population. Responses to prevent its spread, such as vaccination, have been implemented for several years. However, currently available vaccines have a production method with some limitations, resulting in a great effort by the industry to get the necessary doses on the market. This aspect becomes even more relevant when pandemics occur, as happened in 2009. The production of mRNA vaccines is a promising alternative. It is a faster, more flexible, and safer industrial process resulting in high yield production. From the point of view of the efficacy of these vaccines, strategies have been adopted, mainly at the formulation level, to obtain the adequate activation of the innate immune system and thus a better response to the vaccine. Preclinical results have shown that vaccines based on conventional non-amplifying mRNA and self-amplifying mRNA are efficacious in protecting against influenza virus. This, together with the recent market introduction of mRNA-based vaccines for COVID-19, has allowed advancement into clinical trials. There are still challenges to overcome with this new technology, including safety evaluation, but preliminary clinical results suggest that this platform may be a good alternative to the current ones available, representing a new generation of influenza vaccines.

Keywords: influenza virus; flu vaccine; mRNA vaccine; self-amplifying mRNA; clinical trial.

Introdução

O vírus influenza é conhecido há cerca de um século e estima-se que seja responsável por cerca de 3 a 5 milhões de casos de doença grave, dos quais 290 000 a 650 000 resultam em morte, anualmente, em todo o mundo (1).

Devido à variabilidade antigénica do vírus, a imunidade conferida quer pela infeção quer pela vacinação é apenas transitória, surgindo as epidemias sazonais de gripe que têm um grande impacto nos sistemas de saúde. O potencial surgimento de uma nova pandemia de gripe aumenta a necessidade de ter respostas rápidas e eficientes para o controlo desta doença infecciosa.

A vacinação é o método mais eficaz para controlo da gripe, porém as vacinas tradicionais atualmente comercializadas, apesar de apresentarem bom perfil de tolerabilidade e segurança demonstram uma efetividade não muito elevada (2). Isto, em conjunto com as limitações inerentes ao seu método de produção, leva à necessidade de encontrar novas estratégias para reduzir a morbidade e mortalidade causadas pela gripe (3).

Em resposta à pandemia causada pelo SARS CoV-2 (síndrome respiratória aguda grave - coronavírus 2) foram aprovadas as primeiras vacinas de mRNA (RNA mensageiro), em tempo recorde (4). O mRNA representa uma molécula de cadeia simples que é copiada a partir de genes e que contém informação para a síntese de proteínas (5). No caso de vacinas para doenças infecciosas, o mRNA codifica proteínas virais de interesse com função antigénica, induzindo a produção de uma resposta imunitária pelo indivíduo (4).

Algumas empresas já se encontravam a desenvolver candidatos de vacinas de mRNA para a gripe, porém com o surgimento da pandemia COVID-19 e a necessidade urgente de ter soluções rápidas no mercado, estas deixaram as sequências do vírus influenza e passaram a dedicar-se às do SARS CoV-2. Foram necessários apenas 64 dias após a sequenciação do genoma do vírus SARS CoV-2 para a primeira vacina de mRNA (a mRNA-1273 da Moderna) avançar para ensaios clínicos (6). Foi esta concentração de esforços e o facto de a tecnologia ter sido estudada e aperfeiçoada durante anos em outras patologias, que permitiu uma rápida resposta à pandemia instalada (7). O sucesso que se verificou com as vacinas de mRNA para o SARS CoV-2 permitiu o avanço para ensaios clínicos com esta abordagem nas vacinas para a gripe, que já apresentavam resultados pré-clínicos promissores.

Esta revisão tem como objetivo apresentar e analisar os resultados da tecnologia de mRNA nas vacinas para a gripe e como esta pode representar uma alternativa às atuais vacinas comercializadas.

I. Vírus Influenza

Existem quatro tipos de vírus influenza: A, B, C e D. Pertencem à ordem *Articulavirales*, família *Orthomyxoviridae* e gênero *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus* e *Deltainfluenzavirus*, respectivamente. O vírus influenza A é o mais frequente, sendo capaz de infectar o Homem e outros animais. O vírus influenza B afeta quase exclusivamente o Homem, causando doença menos grave que o A. Já o vírus influenza C infeta apenas o Homem manifestando-se de forma leve ou assintomática e os vírus influenza D não são conhecidos por causar infecção no Homem, tendo ambos um impacto mínimo na saúde pública (8).

São vírus pleomórficos envelopados, de cápside helicoidal, constituídos por 8 segmentos diferentes de genoma de ácido ribonucleico (RNA) de cadeia simples e polaridade negativa ((-)ssRNA) no caso dos vírus influenza A e B e 7 nos vírus influenza C e D, de 12 a 14 kb, que codificam as diferentes proteínas virais (9). No vírus influenza A, o envelope lipídico, derivado da membrana citoplasmática da célula do hospedeiro, integra as glicoproteínas de superfície hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) e a proteína de canal iônico M2 (M2). Sob a bicamada lipídica encontra-se a proteína da matriz M1 (M1). Dentro do invólucro do vírus estão os oito complexos de ribonucleoproteína viral (vRNP) constituídos pelo RNA viral associado à nucleoproteína (NP) e três polipéptidos da RNA polimerase (PA, PB1 e PB2) (Figura 1) (10). Consoante o tipo de HA e NA temos diferentes subtipos do vírus influenza A. Até ao momento, foram descobertos 18 subtipos de HA e 11 subtipos de NA, o que se traduz em inúmeras potenciais combinações (8). O vírus influenza B diverge, apenas, em duas linhagens antigenicamente distintas, a Yamagata e a Victoria (11).

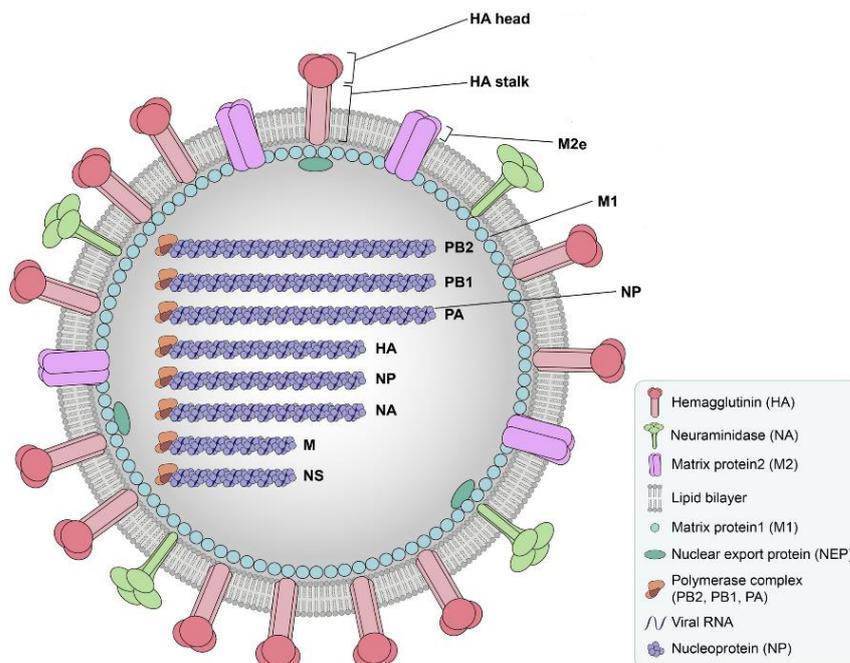


Figura 1 – Estrutura do vírus influenza A com representação de diversas proteínas com potencial para serem usadas como antígenos em vacinas. Adaptado de (21).

Como o vírus influenza apresenta genoma de RNA fragmentado que não tem um mecanismo de correção tão rigoroso quanto o de ácido desoxirribonucleico (DNA), aliado ao facto de conseguir infetar hospedeiros de diferentes espécies, torna-o um vírus suscetível de sofrer elevadas taxas de mutação com consequente variação da sua estrutura antigénica (12). Variações antigénicas menores (*Antigenic Drift*) que podem ocorrer nos vírus influenza A e B, consistem em erros que ocorrem durante a replicação do RNA com acumulação de mutações pontuais nos genes que codificam as proteínas de superfície HA e NA. Ocorrem de forma gradual ao longo do tempo, podendo levar ao aparecimento de novas estirpes dentro do mesmo subtipo, sendo responsáveis pelo aparecimento das epidemias de gripe. É por este motivo que, anualmente, se tem de rever a composição da vacina de modo a proteger das estirpes circulantes, uma vez que o sistema imunológico tem dificuldade em reconhecer o vírus, não conseguindo prevenir a infeção e doença (8). Atualmente, devido à pandemia de COVID-19, notou-se uma redução no número de casos de gripe sazonal nas épocas passadas, uma vez que se tratam ambas de doenças infecciosas causadas por vírus respiratórios, que se transmitem de forma semelhante, as medidas de proteção individual aplicadas na COVID-19 provocaram uma diminuição na transmissibilidade da gripe. Entre setembro de 2021 e janeiro de 2022 foram relatados poucos casos de gripe, a nível global, o que resultou numa diminuição da caracterização das estirpes do vírus em circulação. Neste período a taxa de positividade foi inferior a 3%, comparativamente a, aproximadamente, 17% num período pré-pandémico (13). Esta diminuição da caracterização das estirpes dificulta a decisão da composição vacinal podendo originar numa menor aproximação antigénica às estirpes que irão circular na sociedade e, conseqüentemente, uma menor proteção conferida pela vacina na próxima época de gripe (14).

Variações antigénicas maiores (*Antigenic Shift*) que ocorrem apenas com o vírus influenza A, resultam da recombinação genética entre dois vírus que infetam a mesma célula levando a grandes e importantes alterações da estrutura antigénica viral originando um novo subtipo do vírus que pode desencadear uma pandemia de gripe. Na história da humanidade existiram várias pandemias causadas por este vírus. A de 1918, conhecida como a Gripe Espanhola, provocada por uma estirpe do vírus influenza A H1N1, é relatada como um dos piores surtos de doença infecciosa, contando com cerca de 50 milhões de mortes. Depois desta, foram registadas mais três: em 1957 a gripe asiática provocada pelo H2N2, em 1968 a gripe de Hong Kong provocada pelo H3N2 e mais recentemente, em 2009, a gripe suína provocada por uma nova estirpe do H1N1 (12). Atualmente, existe a preocupação de que estirpes altamente patogénicas, do subtipo H5 e H7, que têm as aves como hospedeiro natural, possam vir a causar pandemias semelhantes (9). No período de 24 de setembro de 2021 a 23

de fevereiro de 2022 foram relatados 25 casos de infecções zoonóticas por H5N6 e 15 casos por H9N2 na China e um caso por H5N1 no Reino Unido (13).

2. Vacinação contra a gripe

A gripe é o nome dado à doença respiratória contagiosa que resulta da infecção primária pelo vírus influenza A e B. Transmite-se, à semelhança de outros vírus respiratórios, de forma direta, através de partículas infecciosas presentes no ar em pequenas gotículas, expelidas pelas pessoas infetadas quando tosse, espirram ou falam e, de forma indireta, menos frequentemente, através do toque em objetos e superfícies infetadas. Os sintomas de gripe podem variar entre febre, dores musculares e articulares, cefaleias, mal-estar geral, tosse seca e dor de garganta. Resultam, essencialmente, da lesão das células epiteliais do trato respiratório e podem manifestar-se entre 1 a 4 dias após infecção. Habitualmente, é uma doença de curta duração com evolução benigna, porém, nos grupos de risco, pode resultar em complicações como pneumonia ou descompensação da doença de base e por isso não pode ser menosprezada. É por isso que estes indivíduos devem ser vacinados anualmente para prevenção da infecção (15).

2.1. História do desenvolvimento das vacinas

Nos anos 30, do século passado, após isolarem o vírus influenza A em 1933, começaram a ser desenvolvidas tecnologias para produção de vacinas para a gripe. Já nos anos 40 foi desenvolvida a primeira vacina com vírus inativado que continha apenas um subtipo do vírus influenza A. O método de produção utilizado baseava-se no crescimento do vírus em ovos embrionados de galinha, o qual se mantém até aos dias de hoje. Depois de ter sido descoberto o vírus influenza B, uma vacina bivalente foi produzida em 1942 de modo a aumentar a eficácia da imunização e em 1945 foi licenciada nos Estados Unidos da América (EUA) e administrada à população (16). Rapidamente se percebeu que o vírus influenza sofria alterações na sua estrutura antigénica pela observação que a imunidade conferida pelas vacinas não era suficientemente protetora com o passar do tempo. Surgiu assim a necessidade de alterar regularmente a composição da vacina bivalente. Em 1978 surgiu um novo vírus H1N1, porém os que circulavam anteriormente para os quais a vacina conferia imunidade, mantinham-se em circulação (17). Por esta razão, surgiram as vacinas trivalentes, as quais se mantiveram durante muito tempo. Simultaneamente, algumas vacinas monovalentes foram sendo desenvolvidas. Em 2007, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a primeira vacina contra o H5N1, vírus que circula ativamente nas aves e é altamente patogénico para humanos apresentando casos esporádicos e, portanto, representando uma ameaça pandémica (17). Em

2009, de modo a dar resposta à pandemia instalada provocada pelo H1N1, foram administradas as vacinas monovalentes contra este vírus (16).

Desde a década de 30, foram sendo desenvolvidas, concomitantemente, vacinas de vírus vivo atenuado e até 2010 todas as vacinas comercializadas eram produzidas em ovos embrionados de galinha (18). Em 2012, as primeiras vacinas de vírus cultivado em células ficaram disponíveis. Neste mesmo ano, notou-se a necessidade da produção de uma vacina tetravalente devido à co-circulação de duas linhagens do vírus influenza B (16).

2.2. Produção das vacinas

No caso das vacinas sazonais, a Organização Mundial de Saúde (OMS) através do programa *Global Influenza Surveillance and Response System* (GISRS), de acordo com os dados epidemiológicos, genéticos, antigénicos e sorológicos, faz uma recomendação, duas vezes por ano, sobre as cadeias específicas de antígenos a incluir na composição das vacinas. Esta informação é publicada em fevereiro para as que vão ser administradas no Hemisfério Norte e em setembro para as do Hemisfério Sul (19, 20). Atualmente, a recomendação passa, maioritariamente, por vacinas tetravalentes, uma vez que são conhecidos 4 subtipos de vírus que circulam ativamente nos humanos, 2 vírus influenza A (H1N1 e H3N2) e 2 vírus influenza B (Yamagata e Victoria). No caso de formulações trivalentes são incluídos os dois subtipos do vírus influenza A e uma das linhagens do vírus influenza B (21, 22).

Posteriormente, as indústrias podem iniciar o seu processo de produção preparando as doses necessárias a ser administradas antes da época de gripe iniciar. As autoridades nacionais ou regionais são responsáveis por aprovar as vacinas para o seu país e por estabelecer as respetivas recomendações atendendo aos objetivos da vacinação para esta doença infecciosa (13).

Os métodos de produção das vacinas registadas atualmente baseiam-se no crescimento do vírus em ovos embrionados de galinha ou em cultura celular. Os ovos embrionados de galinha são o substrato mais comum. É uma tecnologia de produção bem estabelecida e a mais antiga, em que os vírus de interesse são injetados nos ovos e incubados durante vários dias permitindo a sua multiplicação. A produção de vacinas em culturas celulares, mais recente, utiliza células de mamíferos para a multiplicação do vírus permitindo ultrapassar algumas das limitações associadas à produção em ovos. Contudo, apresenta um menor rendimento e um custo de produção superior. A tecnologia recombinante que, ao contrário das anteriores, não necessita do vírus para produção da vacina, surgiu mais tarde com a vantagem de não ter as limitações observadas com as tecnologias das vacinas tradicionais (22, 23).

2.3. Tipos de vacinas

Para proteção contra a gripe encontram-se disponíveis três tipos de vacinas anualmente. As vacinas de vírus inativado, de vírus atenuado e as obtidas por tecnologia de DNA recombinante.

2.3.1. Vacinas inativadas

As vacinas inativadas podem ser de vírus inteiros, de vírus fragmentados ou de subunidades. O vírus cultivado em ovos embrionados ou em células, é recolhido e purificado do substrato e sofre inativação química. As vacinas de vírus inteiros raramente são utilizadas devido ao perfil de reações adversas que apresentam, contudo as de vírus fragmentados e de subunidades, originadas por ruptura do envelope do vírus e purificação dos antígenos de interesse, são extensivamente utilizadas. São administradas por via intramuscular (im) ou subcutânea (sc) e graças à sua elevada tolerabilidade e relativo baixo custo de produção representam grande parte da quota de mercado de vacinas para a gripe (22).

2.3.2. Vacinas vivas atenuadas

As vacinas vivas atenuadas consistem em vírus vivos com virulência reduzida que utilizam como substrato de crescimento os ovos embrionados. Estão aprovadas pela FDA e pela Agência Europeia do Medicamento (EMA) e destinam-se a ser administradas por via intranasal sob a forma de *spray*, o que resulta na produção de imunidade ao nível da mucosa local, com produção de imunoglobulina A secretora (sIgA) específica para o vírus, vantagem relativa à administração im. Contudo, não é seguro administrar este tipo de vacinas em indivíduos imunocomprometidos (22, 24).

2.3.3. Vacinas de HA recombinante (rHA)

As vacinas de rHA não necessitam do vírus para serem produzidas, apenas necessitam de isolar o gene com a informação genética para a síntese da HA de interesse e inseri-lo num sistema de expressão de proteínas, previamente estabelecido pela indústria biotecnológica. Um sistema já experimentado foi o sistema baseado em baculovírus/células de inseto. A vacina de rHA contém uma concentração três vezes superior de HA, comparativamente à inativada, para produzir um bom título de anticorpos (25).

2.4. Limitações das vacinas tradicionais

Os métodos convencionais para fabrico de vacinas para a gripe exigem um longo tempo de produção, entre 6 a 8 meses, e por isso requerem que a escolha das estirpes constituintes

das vacinas sazonais seja feita com algum tempo de distância do período vacinal. Durante este tempo o vírus pode sofrer mutações graças à alta variabilidade antigénica que apresenta, resultando numa menor imunidade conferida pela vacina. Para além destas, outras mutações induzidas durante a multiplicação do vírus nos substratos de fabrico podem resultar em estirpes diferentes das originais, reduzindo a eficácia da vacina, tal como se verificou no período vacinal de 2012/2013 devido à mutação induzida na estirpe H3N2 (26).

A moderada eficácia e efetividade são características das vacinas sazonais para a gripe. Estas variam consoante a época de gripe e as características da população, nomeadamente o género, idade e história imunológica. Os idosos, que representam um dos grupos prioritários para a vacinação, são também dos que apresenta mais baixa efetividade (22).

Na Europa, o programa I-MOVE (*Influenza - Monitoring Vaccine Effectiveness*) promovido pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) estima a efetividade das vacinas através de estudos observacionais com pacientes sintomáticos nos cuidados primários de saúde, em que os resultados são apresentados por faixa etária e por diferentes estirpes do vírus influenza. No geral a efetividade da vacina está estimada como sendo entre 30% a 60% desde a época 2008/2009 (27).

Nos EUA, estudos observacionais do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) indicam que a percentagem de efetividade mais alta registada foi de 60% em 2010/2011 e a mais baixa em 2004/2005 de 10%. Em 2020/2021 a efetividade não foi estimada devido à baixa circulação do vírus e na época passada, 2021/2022, registou-se a percentagem mais baixa desde 2004/2005 (Figura 2) (2).

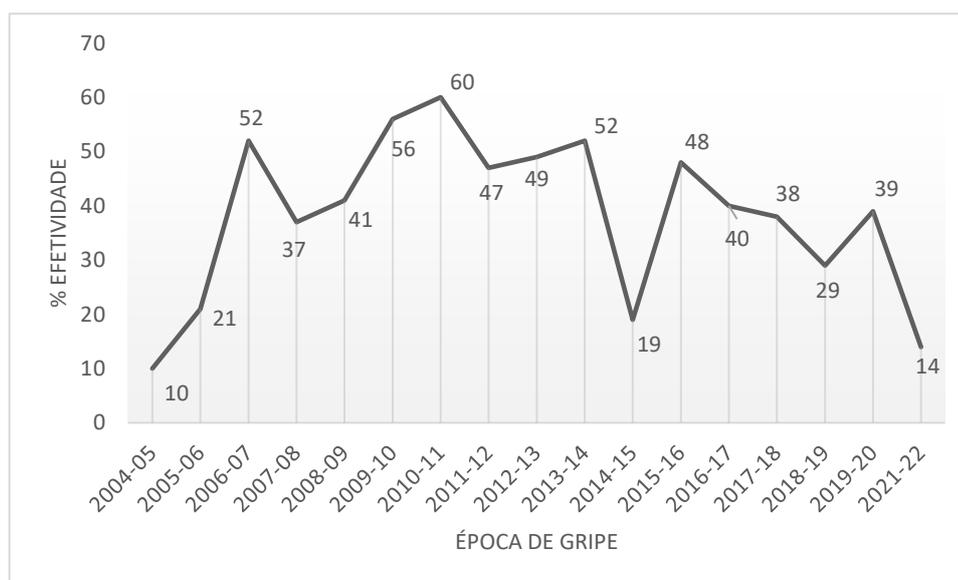


Figura 2 – Estimativa da efetividade das vacinas sazonais da gripe nos EUA desde a época de 2004/2005. Adaptado de (2).

Outras limitações associadas ao método de produção e que podem constituir um risco para a segurança das vacinas são as impurezas por constituintes presentes nos ovos e que não sejam eliminados no processo de purificação, tal como antibióticos, proteínas incluindo a ovoalbumina, formaldeído e, hipoteticamente, outros vírus que possam estar presentes nos ovos. Para além disso, é importante ter em conta a contraindicação das vacinas que utilizam como método de fabrico os ovos embrionados, para pessoas com alergia às proteínas do ovo. Contudo, estas vacinas apresentam um perfil de segurança favorável com uma boa tolerabilidade (22).

Uma produção limitada à quantidade e qualidade do substrato é condicionante quando é necessária uma resposta rápida na colocação de vacinas no mercado. Durante a pandemia de H1N1 em 2009, foram necessários 6 meses para que as primeiras vacinas estivessem disponíveis e mais 2 meses para a produção de todas as doses necessárias. Se a vacina tivesse sido administrada mais rapidamente teria tido uma resposta com maior impacto. A emergência do aparecimento de novas estirpes pandémicas reforça a necessidade de vacinas com fabrico em grande escala e com métodos de produção rápidos (28).

De modo a ultrapassar estas limitações são necessárias novas tecnologias na conceção, e posteriormente na produção de vacinas contra o vírus influenza. Como resposta, as tecnologias baseadas em ácidos nucleicos, DNA e RNA, são consideradas bastante atrativas pela sua facilidade e rapidez de produção, relação custo/efetividade, flexibilidade do design de antígenos e pelo facto de ser um processo livre de patogénicos (não é possível reverter para uma forma virulenta porque não é utilizado o vírus ou parte dele).

Outras plataformas também têm vindo a ser exploradas como as vacinas de vetor viral (18). Porém, a baixa imunogenicidade e possibilidade de integração do material genético do vírus nos cromossomas do hospedeiro associado às vacinas de DNA, e o fabrico complexo e de custo elevado das vacinas de vetores virais fazem com que estas não sejam as mais atrativas para prosseguir para ensaios clínicos (29).

A tecnologia de mRNA, a qual será desenvolvida à frente neste trabalho de revisão, demonstra dar resposta a muitas das limitações das tecnologias convencionais e provou ser um sucesso no caso das primeiras vacinas para a COVID-19, possibilitando um grande avanço em outras doenças infecciosas assim como na terapêutica do cancro.

3. Vacinas de mRNA na prevenção da gripe

O mRNA representa uma molécula de RNA de cadeia simples que contém a sequência de nucleótidos que é traduzida numa sequência de aminoácidos de uma proteína (30).

O potencial das vacinas de mRNA foi pela primeira vez estabelecido quando em 1990 se verificou a expressão de uma proteína *in vivo*, após a administração do mRNA que continha a informação genética para a sua síntese, no músculo-esquelético de murganho (31). O mRNA da vacina utiliza a maquinaria celular do hospedeiro para produzir *in vivo* a proteína (antigénio) de interesse. É reconhecido pelo sistema imunitário inato do organismo induzindo respostas imunitárias humorais e celulares sem o uso do vírus e, por fim, é degradado por processos fisiológicos normais sem risco de toxicidade (32, 33).

Contudo, os primeiros resultados com esta tecnologia manifestaram algumas limitações como a instabilidade e baixa eficiência na entrega *in vivo* da molécula de mRNA, assim como questões de segurança devida à elevada ativação das células do sistema imunitário inato. Deste modo, foi necessário um grande investimento em inovação e desenvolvimento, essencialmente na otimização da molécula de mRNA e desenvolvimento de sistemas de entrega eficientes, que manifestaram resultados bastante promissores principalmente na última década (33).

O risco de aparecimento de uma nova pandemia de gripe e a necessidade contínua de respostas mais efetivas e com menos limitações de produção ao nível da vacinação sazonal, justificam o facto de o vírus influenza ter sido um dos principais alvos de experimentação das vacinas de mRNA antes da pandemia de COVID-19, com vários resultados pré-clínicos publicados, os quais se encontram na Tabela I em Anexo.

3.1. Produção de vacinas de mRNA

Após se isolar e identificar o vírus, é sequenciado o seu genoma e determinado(s) o(s) antigénio(s), caso estes sejam desconhecidos. As sequências são depositadas eletronicamente e disponibilizadas para se poder construir *in silico* o mRNA que fará parte da vacina podendo-se iniciar o processo de produção (32). A *Global Initiative for Sharing All Influenza Data* (GISAID) é uma plataforma que promove o rápido acesso a dados do vírus influenza incluindo as sequências genéticas, útil para produção das vacinas de mRNA, permitindo o acesso livre a investigadores antes da publicação formal.

A produção compreende dois grandes procedimentos: o *upstream* que representa a síntese do mRNA, enzimaticamente através da transcrição *in vitro*, seguindo-se os subsequentes passos de purificação do produto, aos quais se dá o nome de *downstream*.

O processo de fabrico inicia-se pela construção do molde de DNA que é linearizado por uma enzima de restrição e amplificado por *Polimerase Chain Reaction* (PCR). Para além do molde de DNA, os componentes necessários para a transcrição *in vitro* do mRNA são: enzimas como a RNA polimerase DNA dependente, nucleótidos, solventes e agentes tamponantes. A RNA polimerase DNA dependente transcreve o DNA linearizado para uma molécula de mRNA usando os nucleótidos adicionados que podem conter modificações (34).

A estrutura do mRNA sintético é similar ao mRNA eucariótico (29). A molécula deve conter os seguintes elementos estruturais com as respetivas funções: 5'cap que se localiza na extremidade 5' da molécula, protege da degradação pelas exonucleases e promove a iniciação da tradução, uma vez que é o local de ligação do fator de iniciação 4E de tradução eucariótica e da subunidade ribossomal pequena; regiões não traduzidas (UTRs) que controlam a estabilidade e localização da molécula assim como a eficiência da sua tradução; região traduzível (ORF) que contém a sequência de nucleótidos a ser traduzida com início no codão de iniciação AUG e fim no codão de finalização que pode ser UAA, AUG ou UGA; cauda poli-A na extremidade 3' que representa uma cauda de 100 a 250 adenosinas que protege da degradação pelas enzimas e onde se liga a proteína de ligação poli-A responsável também pelo início da tradução (Figura 3) (5, 30, 35). A estrutura cap pode ser adicionada ao mRNA enzimaticamente ou durante a reação de transcrição *in vitro*. Do mesmo modo, a cauda poli-A pode ser codificada a partir do molde de DNA ou, alternativamente, ser adicionada enzimaticamente após transcrição (34).

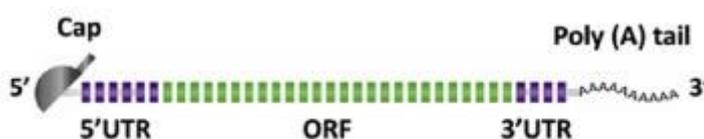


Figura 3 – Elementos estruturais essenciais do mRNA transcrito *in vitro*. Adaptado de (30).

Concluída a etapa de síntese do mRNA inicia-se a fase de *downstream*, em que são removidos os restantes componentes da reação, tais como o molde de DNA, as enzimas e os nucleótidos não utilizados e outros resíduos formados na transcrição do mRNA, tais como os RNA de cadeia dupla (dsRNA), que podem reduzir a potência da vacina *in vivo* (32, 34). À escala industrial os métodos cromatográficos representam a técnica de purificação mais utilizada (30).

O mRNA obtido é uma molécula instável e suscetível à degradação enzimática pelas RNases. É incapaz de atravessar a membrana celular pelo facto de serem ambas - molécula e membrana - carregadas negativamente, havendo repulsão de cargas. Por este motivo,

desenvolveram-se diferentes plataformas de entrega de modo a proteger a molécula da degradação e a ultrapassar as diferentes barreiras biológicas até à entrega eficiente no citoplasma da célula, etapa crítica para a sua efetividade *in vivo* (6). As plataformas ou veículos de eleição no transporte de RNA são baseadas em nanopartículas lipídicas (LNPs). Demonstrou-se que eram um veículo de entrega eficaz, pela primeira vez, no transporte de *small interfering RNA* (siRNA). Porém, outras plataformas também foram sendo desenvolvidas e testadas (34, 36).

As LNPs são sistemas lipídicos à escala nano com quatro componentes principais em diferentes proporções dependendo da ação pretendida: lípido ionizável que permite a encapsulação dos ácidos nucleicos, carregados negativamente, através das interações eletrostáticas uma vez que a pH ácido o lípido adquire carga positiva; fosfolípidos como a distearoil-fosfatidilcolina (DSPC) que suportam a bicamada lipídica permitindo o empacotamento do mRNA e estabilidade da nanopartícula; colesterol que funciona como lípido de suporte e agente estabilizante; e o polietilenoglicol (PEG) que protege e previne a agregação das partículas, controla o seu tamanho e permite prolongar o tempo de meia-vida das LNPs da formulação (4, 33). As LNPs devem apresentar um tamanho e propriedades adequadas de modo a serem captadas pela célula e libertar corretamente a molécula encapsulada. Para além disso, devem apresentar uma atividade adjuvante que melhore a resposta imunitária após a vacinação (33, 34).

Um fator adicional a ter em conta na produção de vacinas de mRNA é a sua intrínseca elevada imunogenicidade. De forma semelhante ao RNA viral, o sistema imunitário do hospedeiro reconhece os mRNAs sintéticos como agentes estranhos. Isto leva à ativação dos recetores de reconhecimento de padrão (PRRs) expressos em células do sistema imunitário inato como as células dendríticas, induzindo a produção de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, principalmente interferão (IFN) do tipo I. Os recetores do tipo *Toll* (TLRs) são os principais PRR que detetam os padrões moleculares associados a patogénios (PAMPs) como os ácidos nucleicos (37). O sistema imunitário inato tem um papel benéfico importante, na medida em que é responsável pela ativação das células apresentadoras de antígenos e por desencadear ou induzir a resposta imunitária adaptativa. Contudo, se esta ativação impedir que a molécula de mRNA entre na célula e seja traduzida na proteína, acaba por ser prejudicial (38). Assim, para que o mRNA não seja o responsável pela excessiva ativação do sistema imunitário inato foram adotadas estratégias como a otimização dos elementos estruturais da molécula, controlo da produção ou eliminação de resíduos de dsRNA resultantes da transcrição, uso de plataformas de entrega adequadas e a incorporação de nucleósidos modificados, nomeadamente a substituição da uridina (U) pela pseudouridina (Ψ) ou pela NI-

metil-pseudouridina (1m Ψ) (39). Descobriu-se que quando os nucleósidos Ψ , 5-metilcitosina (m5C), N6-metiladenosina (m6A), 5-metiluridina (m5U) ou 2-tiouridina (s2U) são incorporados, a maioria dos TLRs deixam de ser ativados, diminuindo a produção de citocinas (40). A finalidade destas estratégias é encontrar um equilíbrio de modo a não ter respostas imunitárias inatas excessivas mantendo a produção de uma resposta imunitária adaptativa balanceada Th1/Th2 que forneça proteção num futuro contacto com o vírus (38).

3.2. Tipos de vacinas de mRNA e resultados pré-clínicos

Existem 2 grandes tipos de vacinas de mRNA que têm vindo a ser desenvolvidos contra o vírus influenza e que se distinguem essencialmente pela sua capacidade de tradução: vacinas baseadas em mRNA não replicante, molécula que codifica o antígeno de interesse, e que pode ou não conter nucleósidos modificados; e vacinas baseadas em mRNA auto-replicante (sa-mRNA), molécula que, para além do antígeno de interesse, codifica a maquinaria de replicação do RNA viral o que permite produzir várias cópias do mRNA *in vivo*, aumentando a quantidade de antígeno traduzido (Figura 4) (35).

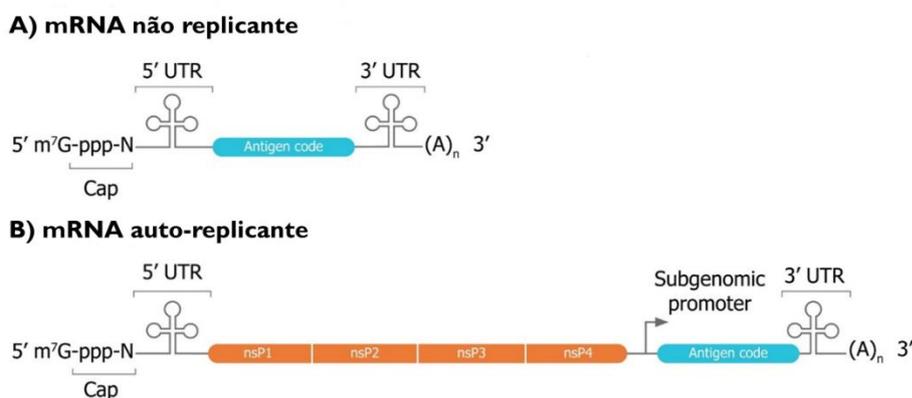


Figura 4 – Comparação das duas moléculas de mRNA que constituem os diferentes tipos de vacinas de mRNA na gripe. Adaptado de (41).

3.2.1. Vacinas de mRNA não replicante

3.2.1.1. Vacinas de mRNA não modificado

Apesar do trabalho que tinha vindo a ser feito com a tecnologia de mRNA desde 1990, o primeiro estudo que demonstrou proteção contra o vírus influenza após vacinação com mRNA em animais foi publicado vários anos depois, em 2012. Várias vacinas de mRNA não modificado complexado com protamina, em que cada uma codificava diferentes antígenos de um vírus H1N1, após administração id em vários modelos animais, induziram uma resposta imunitária protegendo contra a infeção (42).

Mais tarde, um grupo de investigadores afiliados à CureVac, usou uma estratégia de engenharia de sequenciação aplicada ao mRNA não modificado e formulado em LNPs que codificava a HA de um vírus H1N1 e demonstrou não ser necessário o mRNA sofrer modificações químicas para induzir uma resposta imunitária adequada. A importância do veículo de entrega foi comprovada com a administração de um mRNA não encapsulado que, em contraste com a formulação baseada em LNPs, não induziu resposta imunitária (43).

A HA e a NA são os antígenos principais do vírus influenza. Um grupo de investigadores afiliados à Sanofi avaliou a resposta imunitária induzida em dois modelos animais de mRNAs não modificados formulados em LNPs que codificam cada um dos antígenos. A HA induz a produção de anticorpos neutralizantes que impedem a entrada do vírus na célula e a NA induz a produção de anticorpos que inibem a replicação viral. Com as vacinas monovalentes demonstraram a proteção em ambos os modelos animais, mas de modo a testar uma vacina com proteção mais ampla, experimentaram uma abordagem multivalente. A tecnologia baseada em mRNA é especialmente vantajosa pela facilidade de encapsular vários mRNAs, precursores dos diversos antígenos numa mesma vacina. Aqui demonstraram não haver interferência de um antígeno sobre o outro e a produção de um título de anticorpos neutralizantes elevado, apoiando o potencial destas vacinas para a gripe (44).

3.2.1.2. Vacinas de mRNA modificado

De modo a induzir uma estimulação mais equilibrada do sistema imunitário inato possibilitando aumentar a estabilidade e eficiência na tradução da molécula de mRNA, começou a ser estudado o mRNA modificado por introdução de nucleósidos modificados. Os primeiros resultados pré-clínicos publicados com a aplicação desta tecnologia em doenças infecciosas, datam de fevereiro de 2017. Nestes, reportou-se os resultados da aplicação de uma vacina de mRNA modificado contendo o nucleósido 1m Ψ , formulado em LNPs. Este mRNA codificava a proteína prM-E do vírus Zika e induziu respostas imunitárias protetoras em murgos e primatas não humanos (45).

Relativamente ao vírus influenza, e com a emergência do aparecimento de uma nova pandemia de gripe motivada pelos casos registados de H7N9 em humanos na China, no mesmo ano de 2017, a Moderna quis apresentar um sistema que respondesse eficazmente a uma pandemia, para a qual as vacinas tradicionais não se encontravam preparadas em dar resposta. Para isso demonstraram que duas vacinas de mRNA modificado, formuladas em LNPs, que codificavam a proteína HA de um H10N8 e de um H7N9, foram capazes de gerar respostas imunitárias protetoras com perfis de tolerabilidade aceitáveis em vários modelos animais. No mesmo artigo apresentam, ainda, resultados provisórios do ensaio clínico de fase I

(NCT03076385) com o mRNA que codificava a HA do H10N8 demonstrando títulos de anticorpos elevados e perfil de segurança aceitável. Este representou o primeiro ensaio clínico em humanos com resultados publicados que utiliza a tecnologia de mRNA em vacinas para doenças infecciosas. Os resultados promissores permitiram que a outra vacina de mRNA que codificava a HA do H7N9 também entrasse em ensaios clínicos, pouco tempo depois (46).

De modo a encontrar uma combinação de nucleósidos modificados que forneçam uma tradução eficiente da molécula de mRNA que codifica antígenos de um vírus H1N1 e um H3N2, um grupo de investigadores fez uma análise comparativa de diferentes modificações em estudos *in vitro* com células HEK293FT. Concluiu que a síntese proteica foi mais eficiente quando houve a substituição de 100% da U pelo seu análogo Ψ , porém a inclusão m5C e m6A, até 50% e 20%, respetivamente, não influenciou significativamente a eficácia na tradução (47).

Para obter mais informações sobre esta tecnologia promissora vários grupos estudaram o desenvolvimento da resposta imunitária induzida pelas vacinas de mRNA modificado formulado em LNPs que codificava a proteína HA. Alguns utilizam os primatas não humanos como modelo animal, cujo sistema imunitário se assemelha ao humano (48, 49, 50). Os resultados encontram-se na Tabela I em anexo. Na gripe pode ser favorável gerar uma imunidade das mucosas com produção de sIgA que é conseguida pela administração intranasal. Um estudo que utilizou esta via de administração com a tecnologia de mRNA modificado formulado em LNPs, demonstrou a produção de anticorpos, especialmente após a dose de reforço, que protegeu os murganhos da infeção (51).

Grande parte dos estudos feitos utilizam a HA como antígeno, proteína que se encontra à superfície do vírus, capaz de desencadear uma resposta imunitária no hospedeiro com produção de anticorpos neutralizantes. Porém, esta glicoproteína sofre frequentemente mutações o que desencadeia a necessidade de atualizar anualmente as vacinas para a gripe. Os cientistas têm vindo a investigar se proteínas de regiões mais conservadas do vírus induzem uma resposta imunitária adequada de modo a produzir vacinas universais para a gripe. A facilidade em alterar a informação genética para a síntese de qualquer proteína, tornam a tecnologia de mRNA tentadora podendo facilitar esta abordagem (52). A haste da HA, região mais conservada da proteína, é um dos principais alvos para obtenção de vacinas universais. Um grupo de investigadores demonstrou a possibilidade de produção de anticorpos contra a haste e contra a cabeça globular da proteína HA, através da administração de uma vacina de mRNA modificado encapsulado em LNPs que codificava a HA total (53). A combinação de diferentes antígenos - proteínas da estrutura do vírus mais conservadas - na mesma vacina pode induzir uma proteção mais ampla, facto que se verificou num estudo que utilizou a mesma estratégia de mRNA modificado, onde este codificou a haste da HA, a NA, a M2 e a NP (ver

representação na Figura 1) (54). Graças à sua natureza sintética, esta tecnologia permite a rápida incorporação de alterações nos antígenos por alteração da sequência genética, isto permite a contínua melhoria da estratégia atendendo às necessidades do momento (55).

3.2.2. Vacinas de mRNA auto-replicante (sa-mRNA)

A expressão do antígeno *in vivo* é proporcional à quantidade de mRNA transcrito. Graças ao curto tempo de meia-vida e instabilidade da molécula de mRNA, a expressão de antígeno *in vivo* é transitória. Assim, apesar das estratégias de melhoria, com ou sem modificações químicas da molécula, pode ser necessária a administração de grandes quantidades de mRNA e/ou administrações sucessivas até se conseguir resposta imunológica, o que se pode traduzir num grande desafio em algumas situações. Deste modo, vacinas de sa-mRNA, moléculas geneticamente modificadas com capacidade para se replicarem sozinhas, podem vir a resolver esta limitação, uma vez que, com doses mais baixas de mRNA conseguem uma elevada expressão do antígeno. Uma vacina com esta abordagem pode ser particularmente importante numa situação pandémica em que se requer uma grande quantidade de vacinas num curto espaço de tempo (35, 56).

As moléculas de sa-mRNA mais bem estudadas até ao momento são derivadas de genoma de alphavirus de cadeia simples polaridade positiva (como os vírus Sindbis, Semliki Forest e da encefalite equina venezuelana), onde os genes que codificam a maquinaria de replicação do RNA permanecem intactos, mas os genes que codificam as proteínas estruturais do vírus são substituídos pelos genes que codificam o antígeno de interesse. Estas moléculas são maiores do que as de mRNA não replicante porque, para além dos elementos funcionais, contêm uma ORF maior com genes que codificam 4 proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) que irão constituir a maquinaria de replicação do genoma viral (correspondem aos 4 componentes funcionais da RNA polimerase RNA dependente) e vão permitir a amplificação intracelular após imunização (ver representação na Figura 4) (35, 57). Para produção de uma molécula de sa-mRNA, o molde de DNA tem de conter adicionalmente os genes que codificam a maquinaria de replicação de alphavirus, sendo necessário otimizar as condições da reação de modo a aumentar o rendimento (56, 57).

A estratégia de utilização de sa-mRNA numa vacina foi descrita pela primeira vez no ano 1994 em que utilizaram mRNA derivado do vírus Semliki Forest alterando-o de modo a expressar a NP do vírus influenza após a vacinação de murganhos. Verificou-se a produção de anticorpos específicos do antígeno abrindo portas para uma nova abordagem promissora (58). Mais tarde, o mesmo grupo de investigadores com a mesma estratégia, demonstrou que a administração de 10 µg de uma vacina de sa-mRNA não formulado, em murganhos, que

codificava a HA do vírus A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) conseguiu induzir uma proteção parcial contra a infeção (59).

Apesar dos resultados encorajadores a produção destas vacinas manifestava-se mais desafiadora devido à maior dificuldade em encapsular a molécula, uma vez que o seu tamanho se refletia na interação com o veículo de entrega. Ao longo do tempo foram feitos estudos que testaram diferentes abordagens de entrega de sa-mRNA de modo a melhorar esta tecnologia. As nanopartículas de quitosano demonstraram induzir uma maior interação com as células dendríticas promovendo uma entrega mais eficiente da molécula. Dados *in vitro* demonstraram a tradução eficiente das proteínas. Estes resultados foram confirmados *in vivo* com a administração sc em murganhos e coelhos de sa-mRNA encapsulado em nanopartículas de quitosano que codificava as proteínas HA e NP de um vírus influenza, verificando-se a produção de anticorpos específicos dos antígenos (60). Posteriormente, avaliaram a entrega em políplexos de polietilenoimina (PEI) que gerou respostas imunitárias tanto humorais como celulares (61). Outros veículos de entrega de sa-mRNA que codificam a HA aplicados com sucesso foram as nanopartículas de dendrímero e nanoemulsões catiónicas óleo/água (62, 63). Utilizando o sa-mRNA encapsulado em LNPs, um grupo de investigadores associado à Novartis, demonstrou a utilidade desta tecnologia para responder eficazmente a uma pandemia de gripe. Após a sequenciação genética do vírus A/Shanghai/2/2013 (H7N9) a vacina ficou pronta em apenas 8 dias e duas semanas após a primeira administração, os murganhos vacinados apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes que foram considerados protetores duas semanas após a segunda administração (64). Sendo as LNPs um veículo de encapsulação largamente utilizado, investigadores afiliados à GlaxoSmithKline (GSK) procuraram melhorar ainda mais estas nanopartículas. Assim, os investigadores demonstraram que LNPs modificadas com a adição de um derivado de colesterol funcionavam ainda melhor. A molécula derivada do colesterol resultou da introdução de um grupo amina ao qual se ligou a manose. Os autores do estudo reclamam que este derivado do colesterol é hidroliticamente estável e a sua introdução na formulação das LNPs não afetou o tamanho das partículas e induziu uma resposta imunitária mais precoce quando comparada com a resposta dada pelas LNPs sem o conjugado de manose (65).

Do mesmo modo que nas vacinas de mRNA não replicante, foi testada esta abordagem para codificar proteínas mais conservadas do vírus influenza. O sa-mRNA que codificava a NP e a MI do vírus A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) induziu uma imunidade cruzada protegendo os murganhos da infeção por A/Hong Kong/1/1968 (H3N2), traduzindo-se numa abordagem promissora para vacina universal (66).

Comparando diretamente os dois tipos de mRNA (replicante e não replicante), um estudo concluiu que uma quantidade 64 vezes menor de sa-mRNA (1,25 µg de sa-mRNA para 80 µg de mRNA não replicante) foi suficiente para gerar o mesmo nível de proteção tornando-o uma plataforma alternativa bastante atraente (57).

Contudo, o desenvolvimento destas vacinas continua a apresentar alguns desafios. O processo de replicação deste tipo de vacinas *in vivo* mimetiza a infecção viral resultando, inevitavelmente, na síntese de dsRNA que são moléculas que, por si só, estimulam o sistema imunitário. Deste modo, a tentativa de eliminação destes resíduos durante a purificação do produto, não tem um benefício tão notável como acontece nas vacinas de mRNA não replicante, visto que não se consegue inibir a síntese posterior (56, 59). A purificação do sa-mRNA requer métodos aprimorados devido aos maiores desafios inerentes à molécula, continuando os métodos cromatográficos a ser os mais usados (41). De modo a modular a ativação do sistema imunitário inato para aumentar a expressão do antígeno foi desenvolvida uma estratégia em que o sa-mRNA codificava diretamente proteínas inibidoras inatas (IIPs). Isto permitiu escapar ao reconhecimento pelas células imunitárias inatas diminuindo a resposta exagerada de IFN do tipo I (67). A otimização da molécula de sa-mRNA continua a ser uma opção para melhorar a tradução *in vivo* das vacinas de sa-mRNA. No entanto, neste caso, a inclusão de nucleósidos modificados é menos valiosa que no mRNA não replicante pois estes seriam perdidos durante a amplificação *in vivo* (56).

3.3. Ensaios clínicos

Vários projetos apresentaram respostas imunitárias protetoras em ensaios pré-clínicos. Estes estudos laboratoriais demonstraram que a tecnologia era potencialmente segura e eficaz para se poder testar em humanos, o que permitiu a várias empresas o avanço para ensaios clínicos com as suas abordagens. A Tabela I resume os ensaios clínicos em desenvolvimento. Como se pode constatar o número de estudos clínicos ainda é diminuto. Apenas dois estudos respeitantes à fase I foram finalizados pelo que ainda não foi possível introduzir uma vacina de mRNA para a gripe no mercado.

Tabela 1 – Ensaio clínicos com vacinas de mRNA para a gripe

Instituição Promotora / Colaboradores	Nome do produto	Identificação do ensaio registrado no <i>clinicaltrials.gov</i> / Fase	Tipo de mRNA / via de administração	Valência / Antígeno(s)	Data de início	Data (prevista) de finalização	Estado	Ref
Moderna	VAL-506440	NCT03076385 / Fase 1	mRNA-LNP modificado / im e id	Monovalente / HA do H10N8	12/2015	10/2018	Finalizado	68 **
	VAL-339851	NCT03345043 / Fase 1	mRNA-LNP modificado / im	Monovalente / HA do H7N9	11/05/2016	13/08/2018	Finalizado	69 **
	mRNA-1010	NCT05415462 / Fase 3	mRNA-LNP modificado / im	Tetravalente / HA das 4 estirpes recomendadas pela OMS	6/06/2022	22/08/2023	A recrutar	70 **
	mRNA-1020, mRNA-1030	NCT05333289 / Fase 1/2	mRNA-LNP modificado / im	Multivalente / HA e NA de vírus influenza A e B	6/04/2022	11/11/2022	A recrutar	71 **
	mRNA-1073	NCT05375838 / Fase 1/2	mRNA-LNP modificado / im	Multivalente / SARS-CoV-2 e Influenza	13/05/2022	15/12/2022	A recrutar	72 **
Pfizer / BioNTech	PF-07252220 / BNT161	NCT05052697 / Fase 2	mRNA modificado / im	Tetravalente / HA das 4 estirpes recomendadas pela OMS	13/09/2021	9/01/2023	A recrutar	73 **
	Vários produtos *	NCT05227001 / Fase 1	sa-mRNA / im	Não divulgado	28/04/2022	24/04/2023	A recrutar	74 **
CureVac AG / GSK	CVSQIV	NCT05252338 / Fase 1	mRNA não modificado / im	Tetravalente / antígenos das 4 estirpes recomendadas pela OMS	7/02/2022	11/2022	A recrutar	75 **
GSK / CureVac AG	GSK4382276A	NCT05446740 / Fase 1	Não divulgado / im	Monovalente / Não divulgado	25/07/2022	10/05/2023	Ainda sem recrutar	76 **
Sanofi	Não divulgado	NCT05426174 / Fase 1	Não divulgado / im	Monovalente / NA (não divulgado de qual vírus)	16/06/2022	30/11/2023	A recrutar	77 **
Sanofi	Não divulgado	Não se encontra registrado / Fase 1	mRNA-LNP não modificado / Não divulgado	Monovalente / HA do H3N2	Não divulgado	Não divulgado	Não divulgado	78

* PF-07852352, PF-07836391, PF-07836394, PF-07836395, PF-07836396, PF-07867246

** Todos os que se encontram registrados no *clinicaltrials.gov* foram consultados a 15/07/2022.

Legenda: HA – hemaglutinina; id – intradérmica; im – intramuscular; LNP – nanopartícula lipídica; mRNA – RNA mensageiro; NA – neuraminidase; OMS – Organização Mundial de Saúde; sa-mRNA – mRNA auto-replicante; SARS-CoV-2 – síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2.

Os primeiros ensaios clínicos com vacinas de mRNA na gripe foram desenvolvidos pela Moderna e estão registados no *clinicaltrials.gov* com o número NCT03076385 referente à vacina monovalente contra a HA de um H10N8 e o número NCT03345043 referente à vacina monovalente contra a HA de um H7N9 que apresentam a mesma estratégia tecnológica (68, 69). Finalizados ambos os ensaios clínicos de fase I no ano de 2018, os seus resultados correspondem aos únicos resultados clínicos publicados, até à data, que avaliam a segurança e eficácia de vacinas de mRNA contra o vírus influenza, os quais se encontram na Tabela 2 (28).

Tabela 2 – Resultados dos ensaios clínicos com as vacinas de mRNA para a gripe da Moderna

Identificação do ensaio registado no <i>clinicaltrials.gov</i>	Plataforma	Valência / Antígeno(s)	Número e idade participantes/ via de administração/ dose administrada (µg)	Eficácia	Segurança
NCT03076385	mRNA modificado formulado em LNPs	Monovalente / HA do vírus A/Jiangxi-Donghu/346/2013 (H10N8)	201 dos 18 aos 64 anos / im e id / 25, 50, 75, 100 e 400 µg (im) 25 e 50 µg (id)	Dose de 100 µg im induziu título de HAI>1:40 em 100% dos participantes e título de MN>1:20 em 87%. Dose de 25 µg im induziu título de HAI>1:40 em 34,5% comparando com 64,7% na via id.	Não foi reportado nenhum evento adverso grave. RAs locais mais comuns foram dor, eritema e edema no local de injeção. RAs sistémicas mais comuns foram mialgia, fadiga e cefaleias. 2 participantes nas doses de 75 µg im apresentaram RAs de grau 3. Vacinação id apresentou maior taxa de RAs.
NCT03345043	mRNA modificado formulado em LNPs	Monovalente / HA do vírus A/Anhui/1/2013 (H7N9)	156 dos 18 aos 49 anos / im / 10, 25 e 50 µg	Doses 10, 25 e 50 µg atingiram título de HAI>1:40 em 36,0%, 96,3% e 89,7% dos participantes, respetivamente. Título de MN>1:20 em 100% com as doses 10, 25 µg e em 96,6% com a dose de 50 µg.	Não foi reportado nenhum evento adverso grave. RAs locais mais comuns foram a dor e o edema no local de injeção. RAs sistémicas mais comuns foram cefaleias, mialgias e artralgias.

Legenda: HA – hemaglutinina; HAI – inibição da hemaglutinação; id – intradérmica; im – intramuscular; LNP – nanopartícula lipídica; MN – microneutralização; mRNA – RNA mensageiro; RA – reação adversa.

Estes estudos demonstraram que a vacina é segura e capaz de induzir respostas protetoras contra a infeção pelo vírus influenza. Porém, diferentes especialistas manifestaram opiniões divergentes, umas mais otimistas do que outras, acerca do futuro desta nova estratégia de vacinas para a gripe. De qualquer modo, a Moderna foi melhorando a sua tecnologia e, de momento, já apresenta vários outros candidatos em ensaios clínicos. A vacina

que se encontra numa fase mais avançada (fase 3) é a mRNA-1010 que codifica quatro diferentes HAs, presentes na superfície de cada uma das quatro estirpes virais recomendadas pela OMS para a época de gripe 2021/2022 do hemisfério norte (79). É formulada nas mesmas LNPs desenvolvidas para a vacina contra a COVID-19 desta empresa, o que demonstra como estas nanopartículas podem ser usadas com diferentes mRNAs e, deste modo constituir uma tecnologia que é transversal e aplicável em soluções para diferentes doenças infecciosas (7). O ensaio de fase 1/2 com a mesma vacina ainda se encontra a decorrer, registado no *clinicaltrials.gov* com o número NCT04956575, sobre o qual avançaram com resultados preliminares no *Third Annual Vaccines Day*, de 24 de março de 2022. Estes indicam que ao dia 29 após vacinação, os níveis de anticorpos induzidos pela formulação contendo o mRNA-1010 eram comparáveis aos induzidos por uma vacina inativada tetravalente comercializada, para o vírus influenza B e superiores para o vírus influenza A. Quanto ao perfil de segurança não foram observados quaisquer eventos adversos graves, as reações adversas locais mais comuns foram dor no local de administração e tumefação da axila e as sistémicas mais comuns foram mialgias, fadiga e cefaleias, em que a maioria apresentava gravidade de leve a moderada (80). O ensaio de fase 3 é conduzido num número de 6000 participantes com idade superior a 18 anos e os resultados serão comparados com uma outra vacina inativada tetravalente para a gripe sazonal já comercializada, tendo prevista a data de finalização para agosto de 2023 (70).

Mais 2 abordagens apresentadas pela Moderna, candidatas para vacinas sazonais, mRNA-1020 e mRNA-1030, estão a ser testadas numa fase I num mesmo ensaio em que se testam diferentes doses e são comparadas com a mRNA-1010 (71). Estas pretendem aumentar a imunidade conferida pelas vacinas, uma vez que codificam a NA, para além da HA (80). Graças à flexibilidade desta tecnologia, outra grande estratégia apresentada por esta empresa é o desenvolvimento de vacinas de mRNA que confirmam proteção, simultaneamente, a diferentes vírus respiratórios, incluindo influenza, SARS-CoV-2 e vírus sincicial respiratório (RSV), existindo já uma vacina que combina informação genética para proteção contra os 3 diferentes vírus, em ensaios pré-clínicos (79). A mRNA-1073, vacina contra o SARS-CoV-2 e o vírus influenza, está em ensaios clínicos de fase 1/2 em que serão avaliadas a segurança, reatogenicidade e imunogenicidade desta, comparando com a administração simultânea da mRNA-1010 e da mRNA-1273 e com cada uma delas em separado (72).

A Pfizer, em colaboração com a BioNTech, desde 2018, também tem desenvolvido estratégias de mRNA para vacinas contra a gripe. Um ensaio clínico de fase 2 tem como objetivo testar a segurança, tolerabilidade e imunogenicidade de uma vacina tetravalente de mRNA modificado, que codifica antígenos das quatro estirpes recomendadas pela OMS, em participantes dos 65 aos 85 anos. Dependendo do progresso do ensaio clínico e das mudanças

que podem ocorrer nas recomendações ao longo das diferentes épocas de gripe, as estirpes podem ser atualizadas (73, 81). Para além disso, esta empresa tem vindo a explorar o sa-mRNA com aplicações na gripe. Várias preparações de vacinas de sa-mRNA, com diferentes doses, estão a ser testadas em adultos saudáveis com idades entre 18 e 49 anos, num ensaio clínico de fase I (74).

As vacinas de sa-mRNA têm sido alvo de muita pesquisa e investimento por parte da Seqirus, com resultados pré-clínicos promissores. Esta empresa tem como objetivo iniciar ensaios clínicos na segunda metade de 2022 (82).

A CureVac com a sua estratégia de mRNA não modificado otimizado, apresenta uma vacina tetravalente contra o vírus influenza em fase I, em colaboração com a GSK, efetuada desde 2020 (75, 83). Recentemente, apresentaram mais uma candidata em ensaios clínicos, a vacina monovalente GSK4382276A. Ambas as empresas têm trabalhado igualmente em estratégias de mRNA modificado (76, 83).

Uma outra empresa que testou com sucesso a tecnologia de mRNA não modificado foi a Sanofi que adquiriu a TranslateBio em 2021, acelerando o processo de desenvolvimento destas novas vacinas. Em junho de 2021 iniciou um ensaio clínico de fase I de modo a avaliar a segurança e imunogenicidade de uma vacina monovalente de mRNA não modificado formulado em LNPs, que codifica a HA do vírus H3N2. Foram testadas duas diferentes formulações que diferiam na constituição da LNP e no final de 2021 no *Vaccines Investor Event* promovido pela Sanofi, foram apresentados resultados preliminares, os quais foram bastante positivos para uma das formulações, tornando-a um candidato promissor. O avanço na tecnologia de vacinas monovalentes pode ser aplicado em vacinas multivalentes possibilitando uma entrada mais rápida para ensaios clínicos. Para o desenvolvimento das vacinas tetravalentes, a Sanofi testou, em ensaios pré-clínicos, vacinas de mRNA modificado que têm apresentado imunogenicidade semelhante à outra abordagem de mRNA não modificado, sendo expectável que avance para ensaios clínicos ainda em 2022 (78, 84). De modo a melhorar a sua estratégia de vacinas, têm testado a segurança e imunogenicidade de novos antígenos, tal como a NA como podemos ver pelo ensaio clínico registado com o número NCT05426174, uma vez que estudos anteriores já demonstraram que anticorpos contra o antígeno NA aumentam, significativamente, a proteção contra o vírus influenza (77, 78, 85). Tinham ainda como objetivo explorar a combinação dos antígenos HA e NA numa mesma vacina de modo a conferir uma proteção mais ampla, a qual já apresenta resultados pré-clínicos promissores (44).

4. Perspetivas futuras e notas conclusivas

O método de fabrico das vacinas de mRNA proporcionam-lhe vantagens consideráveis relativamente às vacinas tradicionais. Apresenta uma rápida síntese do produto com elevado rendimento e baixa variabilidade de lote para lote, possibilitado pelas reações de transcrição, sem necessidade de um substrato biológico de crescimento eliminando o risco de contaminações do produto causadas por este. É um processo completamente sintético (síntese química) que é reprodutível, padronizado, flexível e facilmente escalável para lotes industriais. No contexto de uma emergência de saúde pública causada por uma estirpe do vírus influenza, onde se requer um rápido desenvolvimento de vacinas, é possível abreviar o processo de introdução no mercado quando a vacina já tenha sido testada clinicamente com outra estirpe (potencialmente pandémica ou sazonal) em que foram usados os mesmos veículos de entrega, obtida por um processo de fabrico aprovado (34). Isto possibilita responder eficazmente a uma futura pandemia de gripe, tal como se verificou com as vacinas de mRNA para a COVID-19. Adicionalmente, com a nova abordagem de sa-mRNA pode conseguir-se reduzir a dose necessária em cada vacina e, idealmente, ser possível uma completa proteção com apenas uma única dose administrada, o que permitiria uma maior adesão à vacinação (4). Para além disso, estas vacinas podem representar uma melhor resposta ao nível da vacinação sazonal contra a gripe. A sua rápida produção possibilita que a recomendação anual feita pela OMS das estirpes para as quais a vacina deve conferir proteção possa ocorrer mais perto da altura da sua administração e assim aumentar a probabilidade de correspondência com as estirpes circulantes. No entanto, para que esta tecnologia possa ser amplamente utilizada, deve atender às questões de sustentabilidade do processo de fabrico. Métodos de produção contínuos que permitam a reutilização dos componentes utilizados, com um sistema de purificação de alto rendimento integrado devem ser considerados no futuro (29).

Apesar de ainda não existirem dados de eficácia e segurança em grande escala nos humanos com as vacinas de mRNA para a gripe, uma vez que estas se encontram apenas em fases clínicas iniciais, as primeiras vacinas de mRNA comercializadas, contra o SARS-CoV-2, da Pfizer-BioNTech e da Moderna, traduzem, em parte, aquilo que podemos esperar com a mesma tecnologia para a gripe. Estas demonstraram atingir cerca de 95% de eficácia na proteção contra a doença COVID-19, o que excedeu as expetativas visto que as tecnologias convencionais utilizadas para proteção contra outros vírus respiratórios apresentavam uma percentagem de eficácia bem mais reduzida (86). Quanto a questões de segurança, um perfil de reações adversas favorável é especialmente importante no caso concreto da gripe em que é necessária uma boa adesão à vacinação anual, principalmente na faixa etária dos idosos,

grupo-alvo da vacinação, no qual a gripe pode ter repercussões mais acentuadas. Deste modo é importante promover ensaios clínicos com participantes neste grupo, tal como os que estão em desenvolvimento pela Pfizer. Contudo, uma preocupação associada a estas vacinas continua a ser a indução de respostas potentes de IFN do tipo I o que pode levar a mecanismos de inflamação mais acentuados. Apesar das evidências de uma alta quantidade de eventos adversos para as vacinas de mRNA da COVID-19, um estudo que compara o perfil de reações adversas após-comercialização, notificadas na base de dados mundial VigiBase, entre as vacinas de mRNA para a COVID-19 e as vacinas tradicionais para a gripe, indica que o perfil geral de segurança foi mais positivo no caso das vacinas de mRNA (87). Para além disso, resultados preliminares de ensaios clínicos de vacinas de mRNA na gripe indicam um perfil de segurança favorável apoiando o avanço com esta estratégia.

A otimização ou modificações químicas da molécula e aperfeiçoamento dos veículos de entrega são estratégias para melhorar continuamente a eficácia e segurança destas vacinas. Contudo, um dos maiores desafios desta tecnologia continua a ser a sua termoestabilidade. A necessidade de armazenamento e distribuição em condições de congelação muito exigentes, de modo a manter a estabilidade e integridade do mRNA, pode tornar-se um grande obstáculo à distribuição em países em desenvolvimento, incapazes de manter as cadeias de frio ainda mais exigentes para as vacinas de mRNA. Como resposta, vários investigadores começam a testar a liofilização como método de obtenção de formulações sólidas (a serem reconstituídas em soluções injetáveis no momento da administração), potencialmente mais estáveis, para atingir a estabilidade das formulações a longo prazo e permitir um armazenamento e transporte das vacinas em condições menos exigentes (88).

Futuramente é importante apresentar uma alternativa que consiga dar resposta à variabilidade antigénica do vírus, de modo a diminuir/eliminar a necessidade de uma vacinação anual. Assim, para conferir uma proteção mais ampla e duradoura com o objetivo de atingir as vacinas universais para a gripe, vacinas multivalentes e que incluem antigénios mais conservados do vírus estão a ser desenvolvidas com a tecnologia de mRNA onde já apresentam resultados pré-clínicos promissores.

Por fim, é de notar que a implementação de uma nova tecnologia de vacinas numa doença infecciosa que já tem opções vacinais no mercado, e que apresentam dados robustos e consistentes, resultado de estudos feitos ao longo de vários anos, torna-se mais desafiadora. Com o impacto que a gripe causa anualmente nos sistemas de saúde, uma nova vacina deve demonstrar uma redução nas complicações causadas pela doença e consequente hospitalização, o que exige estudos de longa duração. Além do mais, as novas soluções serão sempre comparadas com as soluções que já estão no mercado, nomeadamente nas vertentes

de eficácia, segurança e também preço. Todavia, com os resultados promissores apresentados até ao momento e com a larga experiência conseguida com a vacina de mRNA para a COVID-19, a qual facilita as questões regulatórias associadas à sua colocação no mercado, as perspectivas são animadoras quanto ao termos uma nova geração de vacinas para a gripe num futuro próximo.

Bibliografia

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION – **Influenza (Seasonal)**. [Consultado a 1 de maio de 2022]. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
2. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – **CDC Seasonal Flu Vaccine Effectiveness Studies**. [Consultado a 11 de maio de 2022]. Disponível em: https://www.cdc.gov/flu/vaccines-work/effectiveness-studies.htm#anchor_1554754800383
3. MOORE, Kristine A. *et al.* - **A Research and Development (R&D) roadmap for influenza vaccines: Looking toward the future**. *Vaccine*. ISSN 18732518. 39:45 (2021) 6573–6584.
4. PILKINGTON, Emily H. *et al.* - **From influenza to COVID-19: Lipid nanoparticle mRNA vaccines at the frontiers of infectious diseases**. *Acta Biomaterialia*. ISSN 18787568. 131 (2021) 16–40.
5. ALBERTS, Bruce *et al.* – **Biologia molecular da célula**. Trad. de Andrade, Ardala *et al.* Porto Alegre: Artmed, 2017. ISBN 978-85-8271-423-2
6. JEEVA, Subbiah *et al.* - **An update on mRNA-based viral vaccines**. *Vaccines*. ISSN 2076393X. 9:9 (2021).
7. DOLGIN, Elie - **mRNA flu shots move into trials**. *Nature reviews. Drug discovery*. ISSN 14741784. 20:11 (2021) 801–803.
8. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – **Types of Influenza Viruses**. [Consultado a 15 de maio de 2022]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>
9. HUTCHINSON, Edward C. - **Influenza Virus**. *Trends in microbiology*. ISSN 18784380. 26:9 (2018) 809–810.
10. WATANABE, Tokiko; WATANABE, Shinji; KAWAOKA, Yoshihiro - **Cellular networks involved in the influenza virus life cycle**. *Cell Host and Microbe*. ISSN 19313128. 7:6 (2010) 427–439.
11. SHARABI, Sivan *et al.* - **Epidemiological and virological characterization of influenza B virus infections**. *PLoS ONE*. ISSN 19326203. 11:8 (2016) 1–12.

12. LYCETT, Samantha J.; DUCHATEL, Florian; DIGARD, Paul - **A brief history of bird flu**. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. ISSN 14712970. 374:1775 (2019) 0–3.
13. WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2022-2023 northern hemisphere influenza season**. [Consultado a 22 de junho de 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/recommended-composition-of-influenza-virus-vaccines-for-use-in-the-2022-2023-northern-hemisphere-influenza-season>
14. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL – **Seasonal influenza – Annual Epidemiological Report for 2020-2021**. [Consultado a 28 de maio de 2022]. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/seasonal-influenza-annual-epidemiological-report-2020-2021>
15. SNS 24 – **Gripe**. [Consultado a 16 de maio de 2022]. Disponível em: <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infecciosas/gripe/#sec-2>
16. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – **Influenza Historic Timeline**. [Consultado a 11 de maio de 2022]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/pandemic-timeline-1930-and-beyond.htm>
17. HANNOUN, Claude - **The evolving history of influenza viruses and influenza vaccines**. *Expert review of vaccines*. ISSN 17448395. 12:9 (2013) 1085–1094.
18. ROCKMAN, Steven *et al.* - **New technologies for influenza vaccines**. *Microorganisms*. ISSN 20762607. 8:11 (2020) 1–20.
19. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – **Selecting Viruses for the Seasonal Influenza Vaccine**. [Consultado a 11 de maio de 2022]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/prevent/vaccine-selection.htm>
20. WORLD HEALTH ORGANIZATION – **The Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS)**. [Consultado a 8 de junho de 2022]. Disponível em: [https://www.who.int/multi-media/details/the-global-influenza-surveillance-and-response-system-\(gisrs\)#](https://www.who.int/multi-media/details/the-global-influenza-surveillance-and-response-system-(gisrs)#)
21. KIM, Yun Hee *et al.* - **Influenza vaccines: Past, present, and future**. *Reviews in Medical Virology*. ISSN 10991654. 32:1 (2022).
22. WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Vaccines against influenza: WHO position paper – May 2022**. *Weekly Epidemiological Record*. Vol. 97, nº19 (2022), p. 185-208.

[Consultado a 15 de maio de 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/item/who-wer9719>

23. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - **How Influenza (Flu) Vaccines Are Made.** [Consultado a 20 de maio de 2022]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/prevent/how-fluvaccine-made.htm>

24. BEYER, W. E. P. *et al.* - **Cold-adapted live influenza vaccine versus inactivated vaccine: Systemic vaccine reactions, local and systemic antibody response, and vaccine efficacy: A meta-analysis.** *Vaccine*. ISSN 0264410X. 20:9–10 (2002) 1340–1353.

25. COX, Manon M.J. *et al.* – **FluBlok, a recombinant hemagglutinin influenza vaccine.** *Influenza and Other Respiratory Viruses* ISSN 17502659 2:6 (2008) 211–219.

26. SKOWRONSKI, Danuta M. *et al.* - **Low 2012-13 influenza vaccine effectiveness associated with mutation in the egg-adapted H3N2 vaccine strain not antigenic drift in circulating viruses.** *PLoS ONE*. ISSN 19326203. 9:3 (2014).

27. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL – **Influenza Vaccine Effectiveness.** [Consultado a 10 de maio de 2022]. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/seasonal-influenza/prevention-and-control/vaccine-effectiveness>

28. FELDMAN, Robert A. *et al.* - **mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses of pandemic potential are immunogenic and well tolerated in healthy adults in phase I randomized clinical trials.** *Vaccine*. ISSN 18732518. 37:25 (2019) 3326–3334.

29. ROSA, Sara Sousa *et al.* - **mRNA vaccines manufacturing: Challenges and bottlenecks.** *Vaccine*. ISSN 18732518. 39:16 (2021) 2190–2200.

30. KWON, Hyokyung *et al.* - **Emergence of synthetic mRNA: In vitro synthesis of mRNA and its applications in regenerative medicine.** *Biomaterials*. ISSN 18785905. 156 (2018) 172–193.

31. WOLFF, J. O. N. A. *et al.* - **Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo.** *Science*. 247:4949 (1990) 1465–1468.

32. MARUGGI, Giuletta *et al.* - **mRNA as a Transformative Technology for Vaccine Development to Control Infectious Diseases.** *Molecular Therapy*. ISSN 15250024. 27:4 (2019) 757–772.

33. PARDI, Norbert *et al.* - **mRNA vaccines-a new era in vaccinology.** *Nature Reviews Drug Discovery*. ISSN 14741784. 17:4 (2018) 261–279.

34. WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations.** [Consultado a 30 de julho de 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/evaluation-of-the-quality-safety-and-efficacy-of-messenger-rna-vaccines-for-the-prevention-of-infectious-diseases-regulatory-considerations>
35. BRITO, Luís A. *et al.* – **Self-amplifying mRNA vaccines.** *Advances in Genetics.* ISSN 0065-2660. 89 (2015) 179-233
36. KANASTY, Rosemary *et al.* - **Delivery materials for siRNA therapeutics.** *Nature Materials.* ISSN 14764660. 12:11 (2013) 967–977.
37. KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo - **Innate immune recognition of viral infection.** *Nature Immunology.* ISSN 15292908. 7:2 (2006) 131–137.
38. LEE, Sang Joon; RYU, Jin Hyeob - **Influenza Viruses: Innate Immunity and mRNA Vaccines.** *Frontiers in Immunology.* ISSN 16643224. 12 (2021) 1–13.
39. NELSON, Jennifer *et al.* - **Impact of mRNA chemistry and manufacturing process on innate immune activation.** *Science Advances.* ISSN 23752548. 6:26 (2020).
40. KARIKÓ, Katalin *et al.* - **Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability.** *Molecular Therapy.* ISSN 15250016. 16:11 (2008) 1833–1840.
41. BLAKNEY, Anna K.; IP, Shell; GEALL, Andrew J. - **An update on self-amplifying mRNA vaccine development.** *Vaccines.* ISSN 2076393X. 9:2 (2021) 1–26.
42. PETSCH, Benjamin *et al.* - **Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection.** *Nature Biotechnology.* ISSN 10870156. 30:12 (2012) 1210–1216.
43. LUTZ, Johannes *et al.* - **Unmodified mRNA in LNPs constitutes a competitive technology for prophylactic vaccines.** *npj Vaccines.* ISSN 20590105. 2:1 (2017) 1–9.
44. CHIVUKULA, Sudha *et al.* - **Development of multivalent mRNA vaccine candidates for seasonal or pandemic influenza.** *npj Vaccines.* ISSN 20590105. 6:1 (2021).
45. PARDI, Norbert *et al.* - **Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination.** *Nature.* ISSN 14764687. 543:7644 (2017) 248–251.

46. BAHL, Kapil *et al.* - **Preclinical and Clinical Demonstration of Immunogenicity by mRNA Vaccines against H10N8 and H7N9 Influenza Viruses.** *Molecular Therapy*. ISSN 15250024. 25:6 (2017) 1316–1327.
47. STAROSTINA, Ekaterina V. *et al.* - **Construction and immunogenicity of modified mRNA-vaccine variants encoding influenza virus antigens.** *Vaccines*. ISSN 2076393X. 9:5 (2021) 1–14.
48. LIANG, Frank *et al.* - **Efficient Targeting and Activation of Antigen-Presenting Cells In Vivo after Modified mRNA Vaccine Administration in Rhesus Macaques.** *Molecular Therapy*. ISSN 15250024. 25:12 (2017) 2635–2647.
49. LINDGREN, Gustaf *et al.* - **Induction of Robust B cell responses after influenza mRNA vaccination is accompanied by circulating hemagglutinin-specific ICOS+ PD-1+ CXCR3+ T follicular helper cells.** *Frontiers in Immunology*. ISSN 16643224. 8 (2017).
50. PARDI, Norbert *et al.* - **Nucleoside-modified mRNA vaccines induce potent T follicular helper and germinal center B cell responses.** *Journal of Experimental Medicine*. ISSN 15409538. 215:6 (2018) 1571–1588.
51. ZHUANG, Xinyu *et al.* - **mRNA vaccines encoding the HA protein of influenza A H1N1 virus delivered by cationic lipid nanoparticles induce protective immune responses in mice.** *Vaccines*. ISSN 2076393X. 8:1 (2020) 1–17.
52. NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES – **Universal Influenza Vaccine Research.** [Consultado a 8 de julho de 2022]. Disponível em: <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/universal-influenza-vaccine-research>
53. PARDI, Norbert *et al.* - **Nucleoside-modified mRNA immunization elicits influenza virus hemagglutinin stalk-specific antibodies.** *Nature Communications*. ISSN 20411723. 9:1 (2018) 1–12.
54. FREYN, Alec W. *et al.* - **A Multi-Targeting, Nucleoside-Modified mRNA Influenza Virus Vaccine Provides Broad Protection in Mice.** *Molecular Therapy*. ISSN 15250024. 28:7 (2020) 1569–1584.
55. FREYN, Alec W. *et al.* - **Antigen modifications improve nucleoside-modified mRNA-based influenza virus vaccines in mice.** *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*. ISSN 23290501. 22 (2021) 84–95.

56. BLOOM, Kristie; BERG, Fiona VAN DEN; ARBUTHNOT, Patrick - **Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases.** *Gene Therapy*. ISSN 14765462. 28:3–4 (2021) 117–129.
57. VOGEL, Annette B. *et al.* - **Self-Amplifying RNA Vaccines Give Equivalent Protection against Influenza to mRNA Vaccines but at Much Lower Doses.** *Molecular Therapy*. ISSN 15250024. 26:2 (2018) 446–455.
58. ZHOU, X. *et al.* - **Self-replicating Semliki Forest virus RNA as recombinant vaccine.** *Vaccine*. ISSN 0264410X. 12:16 (1994) 1510–1514.
59. FLEETON, Marina N. *et al.* - **Self-replicative RNA vaccines elicit protection against influenza A virus, respiratory syncytial virus, and a tickborne encephalitis virus.** *Journal of Infectious Diseases*. ISSN 00221899. 183:9 (2001) 1395–1398.
60. MCCULLOUGH, Kenneth C. *et al.* - **Self-Replicating replicon-rna delivery to dendritic cells by chitosan-Nanoparticles for translation in vitro and in vivo.** *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. ISSN 21622531. 3 (2014).
61. DÉMOULINS, Thomas *et al.* - **Polyethylenimine-based polyplex delivery of self-replicating RNA vaccines.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. ISSN 15499642. 12:3 (2016) 711–722.
62. BRAZZOLI, Michela *et al.* - **Induction of Broad-Based Immunity and Protective Efficacy by Self-amplifying mRNA Vaccines Encoding Influenza Virus Hemagglutinin.** *Journal of Virology*. ISSN 0022-538X. 90:1 (2016) 332–344.
63. CHAHAL, Jasdave S. *et al.* - **Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal ebola, H1N1 influenza, and Toxoplasma gondii challenges with a single dose.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. ISSN 10916490. 113:29 (2016) 4133–4142.
64. HEKELE, Armin *et al.* - **Rapidly produced SAM® vaccine against H7N9 influenza is immunogenic in mice.** *Emerging Microbes and Infections*. ISSN 22221751. 2 (2013).
65. GOSWAMI, Roshan *et al.* - **Mannosylation of LNP Results in Improved Potency for Self-Amplifying RNA (SAM) Vaccines.** *ACS Infectious Diseases*. ISSN 23738227. 5:9 (2019) 1546–1558.
66. MAGINI, Diletta *et al.* - **Self-amplifying mRNA vaccines expressing multiple conserved influenza antigens confer protection against homologous and heterosubtypic viral challenge.** *PLoS ONE*. ISSN 19326203. 11:8 (2016) 1–25.

67. BLAKNEY, Anna K. *et al.* - **Innate Inhibiting Proteins Enhance Expression and Immunogenicity of Self-Amplifying RNA.** *Molecular Therapy*. ISSN 15250024. 29:3 (2021) 1174–1185.
68. U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. CLINICALTRIALS.GOV – **Safety, Tolerability, and Immunogenicity of VAL-506440 in Healthy Adult Subjects.** [Consultado a 15 de julho de 2022]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03076385>
69. U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. CLINICALTRIALS.GOV – **Safety, Tolerability, and Immunogenicity of VAL-339851 in Healthy Adult Subjects.** [Consultado a 15 de julho de 2022]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03345043>
70. U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. CLINICALTRIALS.GOV – **A Study of mRNA-1010 Seasonal Influenza Vaccine in Adults.** [Consultado a 15 de julho de 2022]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05415462?term=mRNA&cond=influenza&draw=2&rank=2>
71. U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. CLINICALTRIALS.GOV – **A Study of mRNA-1020 and mRNA-1030 Seasonal Influenza Vaccines in Healthy Adults.** [Consultado a 15 de julho de 2022]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05333289?term=mRNA+vaccine&cond=Influenza+Viral+Infections&draw=2>
72. U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. CLINICALTRIALS.GOV – **A Safety, Reactogenicity, and Immunogenicity Study of mRNA-1073 (COVID-19/Influenza) Vaccine in Adults 18 to 75 years old** [Consultado a 15 de julho de 2022]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05375838?term=influenza+virus&cond=mRNA+vaccine&draw=2>
73. U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. CLINICALTRIALS.GOV – **A Study to Evaluate the Safety, Tolerability, and Immunogenicity of a Modified RNA Vaccine Against Influenza.** [Consultado a 15 de julho de 2022]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05052697?term=Pfizer&cond=Influenza+Viral+Infections&draw=3>
74. U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. CLINICALTRIALS.GOV – **A Study to Evaluate Self-Amplifying Ribonucleic Acid (RNA) Vaccine Preparations Against Influenza.** [Consultado a 15 de julho de 2022]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05227001?term=Pfizer&cond=Influenza+Viral+Infections&draw=3>

75. U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. CLINICALTRIALS.GOV – **A Study to Evaluate the Safety, Reactogenicity, and Immunogenicity of Vaccine CVSQIV in Healthy Adults.** [Consultado a 15 de julho de 2022]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05252338?term=mRNA+vaccine&cond=virus+influenza&draw=2>
76. U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. CLINICALTRIALS.GOV – **A Study on the Safety, Reactogenicity and Immune Response of a Vaccine Against Influenza in Healthy Younger and Older Adults.** [Consultado a 15 de julho de 2022]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05446740?recrs=abc&cond=%22Influenza%2C+Human%22&draw=2&rank=3>
77. U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. CLINICALTRIALS.GOV – **Phase I, Randomized, Modified Double-blind, Parallel-group, Active-controlled, Multi-arm, Dose-escalation Study to Assess the Safety and Immunogenicity of Monovalent mRNA NA Vaccine in Adult Participants 18 Years of Age and Older.** [Consultado a 15 de julho de 2022]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT05426174?term=mRNA&cond=influenza&draw=2>
78. SANOFI – **Vaccines Investor Event: Sanofi reiterates confidence in strong growth outlook and showcases pipeline of innovative vaccine candidates.** 1 de dezembro de 2021. Disponível em: <https://www.sanofi.com/en/investors/financial-results-and-events/investor-presentations/Vaccines-Day-2021>
79. MODERNA – **Product pipeline.** [Consultado a 10 de julho de 2022]. Disponível em: <https://www.modernatx.com/research/product-pipeline>
80. MODERNA – **Moderna Vaccines Day.** 24 de março de 2022. Disponível em: <https://investors.modernatx.com/events-and-presentations/Investor-Days/default.aspx>
81. PFIZER – **Pfizer starts study of mRNA-based next generation flu vaccine program.** [Consultado a 12 de julho de 2022]. Disponível em: <https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizer-starts-study-mrna-based-next-generation-flu-vaccine>
82. CSL SEQIRUS – **Seqirus Announces Investment in Next-Generation Influenza Vaccine Technology, Self-Amplifying Messenger RNA (sa-mRNA).** [Consultado a 13 de julho de 2022]. Disponível em: <https://www.seqirus.com/news/seqirus-invests-in-self-amplifying-messenger-rna-technology>
83. CUREVAC – **CureVac Doses First Participant in Phase I Study with Multivalent Influenza Vaccine Candidate Based on Second-Generation mRNA Backbone**

Developed in Collaboration with GSK. [Consultado a 12 de julho de 2022]. Disponível em: <https://www.curevac.com/en/curevac-doses-first-participant-in-phase-I-study-with-multivalent-influenza-vaccine-candidate-based-on-second-generation-mrna-backbone-developed-in-collaboration-with-gsk/>

84. SANOFI – **Sanofi and Translate Bio initiate Phase I clinical trial of mRNA influenza vaccine.** [Consultado a 14 de julho de 2022]. Disponível em: <https://www.sanofi.com/en/media-room/press-releases/2021/2021-06-22-05-00-00-2250633>

85. CATE, Thomas R. *et al.* - **A high dosage influenza vaccine induced significantly more neuraminidase antibody than standard vaccine among elderly subjects.** *Vaccine*. ISSN 0264410X. 28:9 (2010) 2076–2079.

86. TOPOL, Eric J. - **Messenger RNA vaccines against SARS-CoV-2.** *Cell*. ISSN 10974172. 184:6 (2021) 1401.

87. KIM, Min Seo *et al.* - **Comparative safety of mRNA COVID-19 vaccines to influenza vaccines: A pharmacovigilance analysis using WHO international database.** *Journal of Medical Virology*. ISSN 10969071. 94:3 (2022) 1085–1095.

88. MURAMATSU, Hiromi *et al.* - **Lyophilization provides long-term stability for a lipid nanoparticle-formulated, nucleoside-modified mRNA vaccine.** *Molecular Therapy*. ISSN 15250024. 30:5 (2022) 1941–1951.

Anexo

Tabela 1 - Resultados de estudos pré-clínicos com vacinas de mRNA na gripe

Tipo de mRNA e veículo de entrega	Antígeno(s)	Modelo animal/via de administração/dose de mRNA (µg)	Resultados	Ref
mRNA não modificado complexado com protamina	HA, NA, NP do A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)	Murganhos/ id/ 20, 80 µg Furões/ id/ 20, 80, 250 µg Porcos/ id/ 250 µg	Produção de anticorpos que protegeu os murganhos, de todas as idades, da infecção. Imunidade cruzada com produção de células T conseguida com administração da NP do vírus. Nos furões e porcos induziu uma resposta imunitária semelhante a uma vacina autorizada.	42
mRNA não modificado formulado em LNPs	HA do A/Netherlands/602/2009 (H1N1) e do A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)	Murganhos/ im/ 0,5 e 5 µg NHP/ im/ 1, 10, 100 µg	Alta expressão do antígeno nas células musculares com indução de ambiente pró-inflamatório. Indução de forte imunidade celular e humoral. Favorável perfil de segurança da vacina. Resposta imunitária celular superior à obtida por uma vacina inativada com adjuvante autorizada.	43
mRNA não modificado formulado em LNPs	HA e NA de vários vírus influenza A	Murganhos/ im/ 0,016, 0,08, 0,4, 2 µg NHP/ im/ 15, 45, 135, 250 µg	Produção de anticorpos contra a HA e a NA que protegeram contra a morte nos murganhos. Produção de anticorpos contra a HA e a NA nos NHP. Encapsulação de HA e NA na mesma vacina que resultou em títulos equivalente de anticorpos e não houve interferência de um antígeno sobre outro.	44
mRNA modificado formulado em LNPs	HA do A/Jiangxi-Donghu/346/2013 (H10N8) e do A/Anhui/1/2013 (H7N9)	Murganhos/ im, id/ 10 µg dose única; 0,4 e 2 µg dose de reforço Furões/ id/ 10, 50, 200 µg NHP/ im, id/ 200, 400 µg Humanos (ensaio clínico fase I)/ im/ 100 µg	Elevados títulos de anticorpos neutralizantes em todos os animais. Única dose de H7N9 protegeu os murganhos da infecção e reduziu a carga viral nos furões. Resultados provisórios de um ensaio de fase I em humanos com o H10N8 apresentam títulos de anticorpos elevados e perfil de segurança aceitável	46
mRNA modificado não formulado	Haste da HA do A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) e haste da A e proteína M2 do A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)	Murganhos/ im/ 45 µg	Síntese proteica mais eficiente com a substituição de U por Ψ. A inclusão de m5C e m6A (até 50% e 20%, respetivamente) não influenciou significativamente a eficácia na tradução. Produção de anticorpos específicos dos antígenos. Apesar das modificações na molécula a resposta imunitária não foi suficientemente alta com o mRNA não formulado.	47
mRNA modificado formulado em LNPs	HA do A/Jiangxi-Donghu/346/2013 (H10N8)	NHP/ im, id/ 50 µg e 5 µg para formulações com GLA	Indução de elevado título de anticorpos e de células T auxiliares específicas do antígeno após administração pelas duas vias. Rápida mobilização de neutrófilos, monócitos e células dendríticas para o local de administração. Indução de respostas significativas de IFN do tipo I.	48
mRNA modificado formulado em LNPs	HA do A/Jiangxi-Donghu/346/2013 (H10N8)	NHP/ im, id/ 50 µg e 5 µg para formulações com GLA	Indução de título de anticorpos neutralizantes considerado protetor, maior na via id. Células B de memória específicas do antígeno aumentam após cada administração. Aumento de células T auxiliares ICOS+ PD-1+ CXCR3+ que contribuem para produção de anticorpos de alta avides.	49
mRNA modificado por 1mΨ formulado em LNPs	HA do A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)	Murganhos/ id/ 30 µg	Alta resposta de células T auxiliares específicas do antígeno. Título de anticorpos neutralizantes considerado protetor. Aumento da produção de células B. Respostas imunitárias superiores comparativamente a um mRNA não modificado formulado em LNPs.	50
mRNA modificado formulado em LNPs	HA do A/Jlim/JYT-01/2018 (H1N1)	Murganhos/ intranasal/ 12 µg	Indução de anticorpos específicos do antígeno. Após dose de reforço o título de anticorpos neutralizantes subiu consideravelmente. Produção de células T auxiliares. Resposta imunitária induziu proteção dos murganhos contra a morte causada por infecção.	51
mRNA modificado por 1mΨ formulado em LNPs	HA do A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) e do A/California/7/2009 (H1N1)	Murganhos/ im/ 3,10, 30 µg e id/ 10, 30, 90 µg Coelhos/ id/ 50 µg Furões/ im/ 60 µg	Produção de anticorpos contra os dois domínios da HA: haste e cabeça globular, em todos os modelos animais. Indução de imunidade cruzada nos murganhos que protegeu da infecção contra um vírus diferente do mesmo subtipo H1N1 e um vírus de outro subtipo H5N1.	53

Tabela 1 - Resultados de estudos pré-clínicos com vacinas de mRNA na gripe (continuação)

Tipo de mRNA e veículo de entrega	Antígeno(s)	Modelo animal/via de administração/dose de mRNA (µg)	Resultados	Ref
mRNA modificado por 1mψ formulado em LNPs	Haste da HA, NA, M2 e NP do A/Michigan/45/2015 (H1N1)	Murganhos/ id/ 0,005, 0,05, 0,5, 5, 10, 20 µg	Produção de anticorpos específicos do antígeno. A combinação dos diferentes antígenos conferiu proteção contra o vírus H1N1pdm, outros vírus do subtipo H1N1 e ainda H5N8 e H6N5	54
sa-mRNA não formulado	NP do A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)	Murganhos/ im/ 10 µg	Produção de linfócitos T citotóxicos. Células dendríticas representam as principais células apresentadoras de antígenos. Indução de anticorpos IgG específicos para o antígeno.	58
sa-mRNA não formulado	HA do A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)	Murganhos/ im/ 10 µg	Produção de anticorpos específicos do antígeno. Proteção parcial contra a infecção viral.	59
sa-mRNA formulado em nanopartículas de quitosano	HA e NP do A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)	Murganhos/ sc / 0,2 µg Coelhos/ sc / 0,2 µg	Nanopartículas permitem a entrega do mRNA às células dendríticas. Indução de anticorpos específicos dos antígenos, superiores contra a NP.	60
sa-mRNA formulado em políplexos de PEI	HA e NP do A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)	Murganhos/ sc / 0,4 µg	Entrega eficiente da molécula a células dendríticas. Indução de anticorpos específicos dos antígenos. Produção de linfócitos T auxiliares e citotóxicos específicos dos antígenos.	61
sa-mRNA formulado numa nanoemulsão catiônica óleo/água	HA do A/California/7/2009 (H1N1)	Murganhos/ im/ 0,1, 1, 10 µg Furões/ im/ 1,5, 4,5 µg	Indução de anticorpos neutralizantes. Indução de resposta celular caracterizada pela produção de células T auxiliares e citotóxicas específicas da HA. Proteção contra infecção pelo vírus A/California/7/2009 (H1N1) e por um vírus diferente do mesmo subtipo.	62
sa-mRNA formulado em nanopartículas de dendrímero	HA do A/WSN/1933 (H1N1)	Murganhos/ im/ 40 µg	Proteção da infecção por A/WSN/1933	63
sa-mRNA formulado em LNPs	HA do A/California/7/2009 (H1N1) e do A/Shanghai/2/2013 (H7N9)	Murganhos/ im/ 0,1, 1 µg	Título de anticorpos neutralizantes (contra o H1N1) tão elevado quanto o induzido por uma vacina inativa de subunidades, mas inferior ao da mesma vacina com adjuvante. Formulação da vacina de SAM contra o A/Shanghai/2/2013 (H7N9) em apenas 8 dias. Duas semanas após a primeira administração houve indução de anticorpos neutralizantes específicos do antígeno que foram considerados protetores duas semanas após a segunda administração.	64
sa-mRNA formulado em LNPs monossiladas	HA do A/California/7/2009 (H1N1)	Murganhos / im e id/ 0,1 µg	Resposta imunitária melhorada com a utilização de LNP monossilada em ambas as vias de administração	65
sa-mRNA formulado em LNPs	NP e M1 do A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)	Murganhos/ im/ 0,1, 0,2 µg	Produção de IgG específicos da NP e da M1. Indução de células T citotóxicas contra a NP. Proteção da infecção letal por A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) conseguida na administração com os dois antígenos juntos (na mesma formulação ou em formulações diferentes) e com a NP sozinha, mas na M1 sozinha a taxa de sobrevivência foi baixa. Com a infecção por A/Hong Kong/1/1968 (H3N2) a taxa de sobrevivência foi elevada com todas as abordagens.	66
sa-mRNA formulado em políplexos de PEI	HA do A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), do A/California/7/2009 (H1N1), do A/Hong Kong/1/68 (H3N2) e do B/Massachusetts/2/2012	Murganhos/ im/ 20, 80, 120 µg. 1,25 µg. 0,5, 1,5 µg.	1,25 µg de sa-mRNA e 80 µg de mRNA não replicante apresentam resposta imunitária semelhante contra o A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1). SAM formulado induziu um título de anticorpos significativamente superior que o não formulado. A vacina trivalente não apresentou uma proteção superior contra o H1N1 e H3N2 do que a vacina monovalente com a HA de cada um dos vírus.	57

Legenda: 1mψ - NI-metil-pseudouridina; GLA - glucopyranosyl lipid adjuvante; HA – hemaglutinina; id – intradérmica; IFN – interferão; IgG – imunoglobulina G; im – intramuscular; LNP – nanopartícula lipídica; M1 – proteína da matriz M1; M2 – proteína de canal iônico M2; m5C – 5-metilcitosina; m6A - N6-metiladenosina; mRNA – RNA mensageiro; NA – neuraminidase; NHP – primatas não humanos; NP – nucleoproteína; PEI – polietilenoimina; sa-mRNA – mRNA auto-replicante; sc – subcutânea; U – uridina; ψ – pseudouridina.