



Cátia Vanessa Simões Sequeira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Polymeric Nanoparticles for Ocular Gene Therapy” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Doutora Maria Helena Costa Neves Correia Amado, da Doutora Carla Cristina Albano Dias Paiva e da Professora Doutora Eliana Maria Barbosa Souto e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Cátia Vanessa Simões Sequeira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Polymeric Nanoparticles for Ocular Gene Therapy” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Doutora Maria Helena Costa Neves Correia Amado, da Doutora Carla Cristina Albano Dias Paiva e da Professora Doutora Eliana Maria Barbosa Souto e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Cátia Vanessa Simões Sequeira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº2012141850, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada "Polymeric Nanoparticles for Ocular Gene Therapy" apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 08 de setembro de 2017.



(Cátia Vanessa Simões Sequeira)

Agradecimentos

Um enorme obrigado à Universidade de Coimbra e a toda a Faculdade de Farmácia;

À Prof. Dr.^a Eliana Souto, pela disponibilidade com que me orientou ao longo deste últimos meses;

À Dr.^a Helena Amado e a toda a equipa da Farmácia Luciano&Matos e à Dr.^a Carla Paiva e a toda a equipa do Controlo de Qualidade da Farmalabor por toda a simpatia e dedicação com que me instruíram;

Aos amigos que a faculdade me trouxe e que levo comigo para a vida, e àqueles que já estavam presentes na minha vida, por toda a amizade;

Ao meu namorado, o Joel, pela paciência que teve comigo durante estes últimos anos e pela maneira como soube lidar com as minhas alterações de humor derivadas do stress;

E por fim, mas não menos importante, um especial obrigado aos meus pais, ao meu irmão e a toda a minha família, que sempre se preocuparam comigo e sempre me apoiaram nos momentos mais importantes do meu percurso académico.

A todos eles, um sincero obrigado!

Índice

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	9
1) Introdução	10
2) Análise SWOT	10
2.1) Análise SWOT – análise crítica	11
2.1.1) <i>Strengths</i> (Forças)	11
2.1.1.1) Organização do estágio	11
2.1.1.2) Equipa técnica da farmácia	12
2.1.1.3) Desenvolvimento de competências pessoais	12
2.1.1.4) Formações complementares	13
2.1.1.5) Noites de serviço	14
2.1.1.6) Protocolos de Aconselhamento	14
2.1.1.7) Instruções de trabalho	15
2.1.2) <i>Weaknesses</i> (Fraquezas)	15
2.1.2.1) Dificuldade na comunicação com os utentes	15
2.1.2.2) Falta de conhecimentos relacionada com a experiência	15
2.1.2.3) Pouca articulação de conhecimentos teóricos com a realidade de trabalho	16
2.1.3) <i>Oportunities</i> (Oportunidades)	17
2.1.3.1) Campanha Holon	17
2.1.3.2) Reuniões Kaizen	17
2.1.3.3) Auditorias	18
2.1.3.4) Preparação de medicamentos manipulados	18
2.1.4) <i>Threats</i> (Ameaças)	19
2.1.4.1) Horas de maior movimento na farmácia	19
2.1.4.2) Utesntes que não desejavam ser atendidos por estagiários	20
2.1.4.3) Medicamentos Esgotados	20
2.1.4.4) Alteração do P.V.P. dos medicamentos	21
3) Caso Clínico	21
4) Conclusão	22
Referências Bibliográficas	23
Anexos	24

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Lista de Abreviaturas	41
-----------------------	----

1) Introdução	42
2) Análise SWOT	42
2.1) Análise SWOT – análise crítica	43
2.1.1) Strengths (Forças)	43
2.1.1.1) Organização do estágio	43
2.1.1.2) Equipa do CQ	44
2.1.1.3) Segurança no laboratório	44
2.1.1.4) Conhecimentos teóricos e práticos	45
2.1.1.5) Desenvolvimento de competências pessoais	45
2.1.1.6) Procedimentos de utilização de equipamentos	46
2.1.2) Weaknesses (Fraquezas)	46
2.1.2.1) Poucas formações complementares	46
2.1.2.2) Falta de experiência profissional	47
2.1.2.3) Não ter tido oportunidade de estagiar nas outras áreas do	
CQ	47
2.1.2.4) Curta duração do estágio	48
2.1.3) Opportunities (Oportunidades)	48
2.1.3.1) Área em grande crescimento	48
2.1.3.2) Auditorias	49
2.1.3.3) Perceção da dinâmica das análises	49
2.1.4) Threats (Ameaças)	50
2.1.4.1) Poucos farmacêuticos a integrar a equipa	50
2.1.4.2) Manuseamento de produtos perigosos	50
3) Conclusão	51
Referências Bibliográficas	52

“Polymeric Nanoparticles for Ocular Gene Therapy”

Abbreviators	54
Abstract/Key-words	56
Resumo/Palavras-chave	57
1) Introduction	58
2) Ophthalmic administration	59
2.1) The human eye – anatomy and physiology	59
2.2) Ocular administration routes	61
2.2.1) Topical administration	61
2.2.2) Periocular injection	62
2.2.3) Intravitreal injection	62

2.2.4) Subretinal injection	63
2.2.5) Suprachoroidal injection	63
2.2.6) Intracameral injection	64
2.2.7) Intravenous injection	64
2.3) Barriers to the ophthalmic administration	65
3) Plasmid design for enhanced transgene expression	67
4) Polymeric Nanoparticles	68
4.1) PLGA and PLA nanoparticles	69
4.1.1) PLGA nanoparticles	70
4.2) Polyethylenimine nanoparticles	73
4.3) Chitosan nanoparticles	74
4.4) Poly-L-lysine nanoparticles – CK30	75
4.5) Dendrimers	77
4.5.1) PLL dendrimers	78
4.5.2) PAMAM dendrimers	79
4.5.3) PEI dendrimers	80
4.6) Others nanoparticles	80
5) Conjugation with polyethylene glycol and hyaluronic acid	81
6) Toxicity	82
7) Conclusions	83
References	84

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas

DCI – Denominação Comum Internacional

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica

FOFA – Forças, Oportunidades, Fraquezas, Ameaças

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

IVA – Imposto sobre o Valor Acrescentado

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

OPL – *One Point Lesson*

P.V.P. – Preço de Venda ao Público

SNS – Serviço Nacional de Saúde

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

I. Introdução

O Estágio Curricular é a etapa final do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas e, para muitos alunos, é o primeiro contato com a vida profissional e com o mercado de trabalho. O meu estágio em Farmácia Comunitária foi realizado na Farmácia Luciano&Matos, em Coimbra, sob orientação da Dr.^a Maria Helena Costa Neves Correia Amado.

A Farmácia Luciano&Matos encontra-se em funcionamento desde 1929 exercendo durante muitos anos funções de armazém de medicamentos, droguaria e farmácia, assumindo exclusivamente esta última função em 1995, data a partir da qual a propriedade passa para a Dr.^a Helena Amado, atual proprietária e diretora técnica. Desde 2009, a Farmácia Luciano&Matos integra o Grupo Holon, um grupo de farmácias independentes e autónomas que partilham a mesma marca, imagem e forma de estar (1).

É em Farmácia Comunitária que o farmacêutico pode aplicar diretamente todo o seu conhecimento relativo a medicamentos e produtos de saúde para ajudar a população. Assim, com a evolução desta profissão, o Farmacêutico deixou de ser, apenas, um especialista do medicamento e passou a ser, também, um agente de saúde pública que intervém de forma ativa na saúde da população, sendo o bem-estar do utente a sua maior preocupação. Com o estágio em Farmácia Comunitária é possível observar de perto e colocar em prática grande parte das ações descritas no Ato Farmacêutico e todos os conhecimentos adquiridos ao longo do MICF. É a realizar esta atividade que percebemos como a farmácia proporciona aos utentes um serviço completo e direcionado para a satisfação das suas necessidades.

Neste relatório irei apresentar uma análise *SWOT* do meu estágio em Farmácia Comunitária, onde analiso todos os pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças que considere pertinentes ao longo deste período.

2. Análise SWOT

Os estágios podem ser avaliados através de uma análise *SWOT* (*Strengths* – *Weaknesses* – *Opportunities* – *Threats*) ou, em português, análise FOFA (*F*orças – *O*portunidades – *F*raquezas – *A*meaças). Na seguinte tabela apresento, de forma esquematizada, a análise *SWOT* do meu estágio em Farmácia Comunitária onde podemos encontrar os aspetos positivos na coluna da esquerda e os aspetos negativos na coluna da

direita enquanto na metade superior se encontram os fatores de origem interna e na metade inferior, os de origem externa.

Tabela I – Resumo da Análise SWOT"

FORÇAS	FRAQUEZAS
<ol style="list-style-type: none">1) Organização do estágio2) Equipa técnica da farmácia3) Desenvolvimento de competências pessoais4) Formações complementares5) Noites de serviço6) Protocolos de Aconselhamento7) Instruções de trabalho - <i>OPLs</i>	<ol style="list-style-type: none">1) Dificuldade na comunicação com os utentes2) Falta de conhecimentos relacionada com a experiência3) Pouca articulação dos conhecimentos teóricos com a realidade de trabalho
OPORTUNIDADES	AMEAÇAS
<ol style="list-style-type: none">1) Campanha Holon2) Reuniões <i>Kaizen</i>3) Auditorias4) Preparação de medicamentos manipulados	<ol style="list-style-type: none">1) Horas de maior movimento na farmácia2) Uteses que não desejavam ser atendidos por estagiários3) Medicamentos esgotados4) Alterações do P.V.P. dos medicamentos

2.1 Análise SWOT – análise crítica

2.1.1) Strengths (Forças)

2.1.1.1) Organização do estágio

O principal aspeto que considero um ponto forte do meu estágio é a organização do mesmo. Desde o início até ao fim, a Farmácia Luciano&Matos demonstrou ser uma farmácia apta a receber estagiários, tendo um plano de estágio completamente bem definido para nos orientar: nas primeiras semanas o objetivo do estágio foi conhecer os produtos vendidos na

farmácia, bem como o seu local de arrumação e a dinâmica dos preços nela praticada e, tendo isso em consideração, a primeira etapa do estágio foi a recepção de encomendas e arrumação dos produtos; de seguida foi-nos dada uma explicação referente aos diferentes sistemas de saúde e planos de participação com os quais nos deparamos mais frequentemente aquando do atendimento e referente também à dinâmica da organização da faturação (por planos de participação e por lotes), que tem de ser enviada ao INFARMED periodicamente; após percebermos o que o farmacêutico faz “por trás dos olhos dos utentes”, chega o primeiro contacto com o público – o gabinete do utente – local onde se fazem as medições dos parâmetros analíticos (pressão arterial, glicémia, colesterol, triglicéridos e bioimpedância) e um aconselhamento direccionado para a otimização desses parâmetros consoante os objetivos terapêuticos adequados a cada utente; a etapa seguinte é uma das mais importantes do estágio e aquela pela qual mais ansiamos: o atendimento ao público, fase em que começámos por observar detalhadamente o atendimento dos farmacêuticos e dos técnicos de farmácia e em que, de seguida, podemos atender, de forma responsável, os utentes da farmácia; por fim, numa última etapa do estágio, tivemos a oportunidade de ir até ao laboratório de manipulação, aprender a preparar alguns medicamentos manipulados.

2.1.1.2) Equipa técnica da farmácia

A Farmácia Luciano&Matos dota de uma equipa brilhante, liderada pela Dr.^a Maria Helena Costa Neves Correia Amado, Diretora Técnica da farmácia e Membro da Gerência, função que partilha com o Eng. José Amado. A farmácia conta também com a Dr.^a Andreia Rocha, farmacêutica adjunta, com a Dr.^a Rosa Cunha, a Dr.^a Melanie Duarte, a Dr.^a Carmen Monteiro, gestora da qualidade, e o Dr. Gonçalo Lourenço, todos eles farmacêuticos de grau I, com a Dr.^a Mónica Gomes, farmacêutica em estágio profissional, com o Sr. Manuel Rodrigues e com Susana Ribeiro, ambos técnicos auxiliares de farmácia, com o Filipe André, funcionário que dá apoio ao armazém e com a D. Rosa Cortesão, auxiliar de limpeza (1). Todos os membros da equipa sempre demonstraram interesse em ajudar os estagiários com qualquer problema que surgisse, particularmente importante para mim, aqueles que me ajudaram na parte mais difícil do estágio, o atendimento dos utentes, por toda a disponibilidade e paciência com que o fizeram.

2.1.1.3) Desenvolvimento de competências pessoais

Um dos maiores proveitos que tirei do meu estágio foi o grande desenvolvimento das minhas competências pessoais, em que destaco a capacidade de organização, a capacidade de comunicação, a capacidade de adaptação às mais diversas situações e autonomia.

A Farmácia Luciano&Matos é uma das instituições mais organizada que conheço e dota de uma filosofia que tudo tem que ver com o seu modo de trabalho: “um lugar para cada coisa e cada coisa no seu lugar”. Assim, de forma a encaixar-me e enquadrar-me na equipa, uma das capacidades que mais desenvolvi foi a de organização – se no início do estágio tinha de me esforçar para entender e cumprir toda a dinâmica de entrada e saída de produtos, de fluxo de objetos, entre muitas outras coisas, no final do estágio, toda essa organização se tinha entranhado no meu dia-a-dia e acontecia naturalmente. A comunicação, como irei falar mais adiante, foi um dos obstáculos que tive de ultrapassar durante o meu estágio e por isso, foi uma das capacidades que mais demorou a desenvolver mas, que maior crescimento teve, principalmente, com os utentes da farmácia. Por vezes deparei-me com situações na farmácia que exigiram de mim uma capacidade de adaptação que inicialmente eu não tinha e com as quais, com o tempo, tive de aprender a lidar e superar, muitas vezes saindo da minha zona de conforto, o que levou a desenvolvimento desta minha capacidade. Por fim, a equipa da farmácia sempre incentivou os estagiários a serem autónomos e a desenvolverem por si a capacidade de iniciativa, sem que isso prejudicasse a nossa prestação no estágio. Essa posição da equipa fez-me crescer a nível profissional, enquanto futura farmacêutica, uma vez que ter autonomia é uma das características mais procuradas no mercado de trabalho pelas entidades empregadoras.

2.1.1.4) Formações complementares

Na farmácia Luciano&Matos tive a possibilidade de assistir às mais diversas formações que surgiram ao longo do tempo de estágio. Para além de formações dadas por entidades externas às farmácias da zona de Coimbra, em que toda a equipa da farmácia era convidada a assistir, inclusive os estagiários, também foi possível assistir a formações na farmácia dadas por entidades externas que nos apresentavam os produtos das marcas que representavam, a fim de pudermos estar mais bem preparados e com total informação acerca do produto para um posterior e fundamentado aconselhamento aos utentes, e também a formações dadas pelos próprios colaboradores da farmácia. No âmbito das formações dadas por entidades externas às farmácias da zona centro destaco a formação da Universidade GSK “Gestão de Categorias – como potenciar a categoria de higiene oral na farmácia”, a formação da Pharma Nord “Deficiência em Selénio – uma ameaça silenciosa” e “Q10: energia para o coração” e ainda uma formação dada por um médico pneumologista sobre os diferentes inaladores utilizados em Asma e DPOC e as referentes técnicas de inalação; nas formações dadas por entidades externas que vieram à farmácia apresentar os seus produtos destaco a formação acerca da pílula do dia seguinte “ellaOne” da HRA Pharma; por fim, também tivemos formação, dada por colaboradores da farmácia, acerca das principais marcas de cosmética

vendidas na farmácia e possibilidade de vermos uma apresentação acerca dos principais problemas dermatológicos com os quais nos deparamos durante o atendimento aos utentes, que merecem um aconselhamento mais cuidado da nossa parte.

2.1.1.5) Noites de serviço

A farmácia Luciano&Matos é uma das farmácias destacadas para escala de serviço permanente na zona de Coimbra. Como sempre tive curiosidade para saber qual a diferença entre as situações que surgiam durante um dia normal da farmácia e um dia em que esta esteja de serviço propus-me, sem obrigatoriedade de tal, para ir estagiar num destes dias. Com esta experiência pude constatar que, apesar de haver as mais diversas situações, a maioria das pessoas procura a farmácia após a ocorrência de um episódio de urgência hospitalar. Tendo feito horário apenas até às 24 horas, consegui perceber que as pessoas que vêm à farmácia após uma urgência, vêm frustradas, cansadas e esperam ser atendidas rapidamente, com todos os produtos indicados na receita, sem dúvidas de como fazer o tratamento indicado pelo médico e como proceder caso não haja melhoras. A percepção que fui tendo ao longo do dia de serviço é que são procurados todos os tipos de produtos que a farmácia vende, no entanto, os produtos com mais saída são antibióticos, anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos, solicitados com prescrição médica.

2.1.1.6) Protocolos de aconselhamento

Um ponto que considero forte e uma grande ajuda ao sucesso do meu estágio reside no facto de existirem protocolos de aconselhamento (ver Anexo I) na farmácia. Estes protocolos de aconselhamento tratam-se de guias que o profissional de saúde em farmácia deve seguir para um atendimento otimizado e focado numa situação específica que o utente apresente. Um protocolo de aconselhamento descreve, numa primeira parte, uma determinada situação, com a sua caracterização e avaliação diferencial, por forma a distingui-la de outras situações semelhantes; após identificada a situação em causa, o protocolo indica quais as perguntas que devem ser feitas ao utente e quais os critérios que requerem referenciação para consulta médica; numa última parte, o protocolo apresenta os tratamentos farmacológicos adequados para o tratamento da situação descrita e as medidas não farmacológicas que devem ser recomendadas pelo farmacêutico ao utente. No meu ponto de vista, este tipo de auxiliar torna-se muito útil, especialmente para os estagiários, porque dada a pouca experiência profissional, podemos, ao estudá-los previamente, preparar-nos de uma forma mais completa para um atendimento que nos seja solicitado ao balcão, fazendo as perguntas corretas ao utente e satisfazendo a sua necessidade da melhor forma possível.

2.1.1.7) Instruções de trabalho - OPLs

Numa perspetiva de organização e de minimizar perdas de tempo, existem na farmácia diversas instruções de trabalho (ver Anexo II), que esquematizam algumas tarefas. As instruções de trabalho consistem num fluxograma de imagens sequenciais que descrevem uma determinada tarefa, tendo cada imagem uma pequena legenda explicativa. O grande objetivo das instruções de trabalho é o de, qualquer pessoa que precise de executar uma tarefa com a qual nunca tenha tido contacto, ao olhar para a instrução de trabalho, consiga perfeitamente seguir o fluxograma e, sem dúvidas, executar a tarefa em questão. A existência destes documentos, a meu ver, são uma grande ajuda aos estagiários, uma vez que, após os colaboradores da farmácia nos ensinarem a executar determinada tarefa, se nos aparecerem dúvidas a meio da execução quando estivermos independentes, basta olhar para a *OPL* para ficarmos com a dúvida esclarecida e não necessitarmos de solicitar a ajuda de um colaborador, apesar de estarem sempre disponíveis para tal.

2.1.2) Weaknesses (Fraquezas)

2.1.2.1) Dificuldade na comunicação com os utentes

Uma das maiores dificuldades que encontrei ao longo do estágio foi a comunicação com os utentes. Tendo em conta que a maioria dos utentes da farmácia eram pessoas idosas, as palavras que, para mim, seriam as mais corretas a utilizar, não eram adequadas para explicar aos utentes o que eles precisavam de saber. Ao início apercebia-me que, muitas vezes, a maneira como eu explicava ao utente como deveria utilizar os medicamentos, como os deveria guardar, os efeitos que eles poderiam provocar, não era a maneira mais esclarecedora para eles e cheguei a constatar, no final de um atendimento, que o utente não tinha entendido o que eu lhe tinha dito. Para mim esta situação era extremamente preocupante porque havia risco de o utente ir para casa e não tomar a sua medicação corretamente e, ao longo do tempo tive de encontrar palavras mais simples e frases mais fáceis de o utente fixar, nunca o deixando sair da farmácia sem me certificar de que sabe o que fazer quando chegar a casa, e de que não tem dúvidas quanto à medicação.

2.1.2.2) Falta de conhecimentos relacionada com a experiência

Outro facto que se tornou uma barreira durante o meu estágio, ainda que previsível, e com o qual me deparei logo nos primeiros dias de contacto com os utentes está relacionado com a falta de experiência profissional que nós, estagiários, temos. Muitas vezes, quando o utente chegava à farmácia a solicitar aconselhamento para uma determinada situação, era difícil para mim, lembrar-me das diferentes alternativas capazes de satisfazer

essa necessidade que não as mais comuns, e essas, frequentemente, o próprio utente dizia que já tinha experimentado e procurava algo diferente. Nesses casos, inevitavelmente, acabava por ir perguntar a um dos colaboradores da farmácia, para poder continuar o atendimento com segurança e certa de que estava a aconselhar ao utente o que ele necessitava. Situação semelhante acontecia, por vezes, quando o utente chegava à farmácia com uma receita onde estavam prescritos vários medicamentos por DCI a solicitar um medicamento pelo nome de marca e, para mim, tornava-se difícil identificar a linha de prescrição a que se estava a referir, o que tornava o atendimento mais demorado. Como é óbvio, no final do estágio este problema já não ocorria com tanta frequência, uma vez que fui adquirindo estes conhecimentos ao longo do tempo.

2.1.2.3) Pouca articulação de conhecimentos teóricos com a realidade de trabalho

Um aspeto que considerei um ponto fraco do meu estágio diz respeito a algumas temáticas em que senti ter poucos conhecimentos, não só relacionados com a escassa experiência profissional, mas também porque poderiam ter sido abordados de forma diferente nas aulas de MICF. Penso que o plano curricular do MICF tem tudo para preparar um aluno para a vida profissional, no entanto, acho que algumas unidades curriculares, apesar de terem muito potencial, não estão organizadas por forma a que consigamos tirar o devido proveito dos conhecimentos adquiridos e aplica-los na prática. Um exemplo do que me estou a referir é a área de Dermofarmácia e Cosmética, onde há um leque de linhagens de produtos adequados a uma dada finalidade e, dentro de cada linhagem, há uma variedade de produtos, cada um com sua função. Ora, nesta área, quando chega à farmácia um utente a procurar aconselhamento, na maioria das vezes para satisfazer todas as necessidades da pele desse utente é necessário saber escolher os produtos certos de cada linhagem e conjuga-los com outras linhagens para conseguir um resultado melhorado. Na minha perspetiva, e tendo em conta que é isso que o utente procura quando vai à farmácia, toda esta dinâmica de conjugação de produtos deveria ser explorada na faculdade, nomeadamente na unidade curricular de “Dermofarmácia e Cosmética”, através, por exemplo, de casos práticos. Também as áreas de Puericultura e de produtos de Ortopedia, apesar de não serem as mais frequentemente solicitadas de aconselhamento, deveriam ser exploradas nas aulas, por forma a termos uma noção da variedade de produtos que existe e qual a sua finalidade. Por fim, dados todos os conhecimentos que adquirimos ao realizar o estágio curricular, acho que também seria de extrema importância que no percurso académico tivéssemos outras experiências de prática profissional, ou seja, outros estágios, para desde cedo começarmos a

ter consciência do que é a vida profissional e a ter contacto com outras realidades de trabalho que não apenas uma, como existe de momento.

2.1.3) Oportunities (Oportunidades)

2.1.3.1) Campanha Holon

A farmácia Luciano&Matos, como referido anteriormente, é uma farmácia pertencente ao grupo Holon e por isso o seu funcionamento tem algumas particularidades. Uma delas é a Campanha Holon, um conjunto de produtos que, não sendo exclusivamente marca Holon, são de laboratórios parceiros. A Campanha é mensal e os produtos que nela constam, assim como os respetivos objetivos de vendas são definidos pelo Grupo Holon. Normalmente a Campanha é delineada de acordo com a época do ano em que estamos, o que me fez considerá-la uma oportunidade dado que foi uma forma de facilmente ficar a conhecer de perto produtos cuja indicação terapêutica era a mais frequentemente solicitada de aconselhamento ao balcão durante aquele período. Por exemplo, durante os dois primeiros meses do estágio, na Campanha constavam imensos produtos adequados a gripes e constipações e, mais tarde, produtos adequados às alergias típicas da Primavera. Também na receção de encomendas, a Campanha apresentava alguns detalhes que não dispensavam a máxima atenção: os preços de venda à farmácia eram tabelados, assim como os P.V.P. recomendados, dando-me a conhecer uma dinâmica de alteração de preços e margens pouco comuns que não teria oportunidade de aprender numa outra farmácia não pertencente ao Grupo Holon.

2.1.3.2) Reuniões Kaizen

Tendo em conta a filosofia de trabalho na farmácia Luciano&Matos, uma das rotinas que tive oportunidade de presenciar são as chamadas “reuniões Kaizen”, realizadas, por norma, de dois em dois dias. Estas reuniões tinham por objetivo a melhoria contínua de todos os aspetos referentes à farmácia, sendo o local onde se discutiam todos os problemas que surgiam e se definiam estratégias para os solucionar. Também nestas reuniões eram discutidas todas as ações a por em prática no dia-a-dia da farmácia, dando-se a conhecer a todos os colaboradores da equipa, de modo a integrar todos nessa ação. Os objetivos da campanha Holon, também eram apresentados nestas reuniões e o estado de sucesso era avaliado regularmente, para que todos pudéssemos saber quais os produtos a que devíamos dar maior relevo no atendimento, de modo a cumprir os objetivos delineados. Para mim foi uma grande oportunidade a existência destas reuniões uma vez que podia participar

ativamente na discussão e ficar a par dos assuntos de maior importância que me poderiam dizer respeito.

2.1.3.3) Auditorias

Enquanto estive a estagiar, a farmácia Luciano&Matos foi uma das empresas candidatas ao prémio *Kaizen* e por isso foi alvo de algumas auditorias e da visita do júri do concurso. Para mim foi uma grande oportunidade ter a possibilidade de assistir de perto a uma auditoria, ficando a conhecer os procedimentos que decorrem ao longo da mesma, o que poderá ser muito útil um dia em que esteja a trabalhar numa empresa que vá ser alvo de uma inspeção deste género.

2.1.3.4) Preparação de medicamentos manipulados

A farmácia Luciano&Matos é uma das farmácias de Coimbra mais solicitada para a produção de medicamentos manipulados, cujas colaboradoras responsáveis por esta tarefa são a Dr.^a Mélanie Duarte e a Dr.^a Carmen Monteiro. Uma das etapas finais do estágio foi a possibilidade de produzir dois medicamentos manipulados, na íntegra, sob a orientação e supervisão da Dr.^a Mélanie. No meu caso, produzi Cápsulas de *Cáscara Sagrada*, *Boldo* e *Centella Asiática*, e uma pomada de Propionato de clobetasol e ácido salicílico a 5%.

Cápsulas de *Cáscara Sagrada*, *Boldo* e *Centella Asiática*

Nesta formulação cada cápsula deveria conter 40mg de *Cáscara Sagrada*, planta que promove a regulação do trânsito intestinal, 50mg de *Boldo*, extrato com ação digestiva e 150mg de *Centella Asiática*, muito utilizada pela sua ação diurética. Tendo em conta os componentes destas cápsulas, a sua indicação terapêutica será como auxiliar de um processo de emagrecimento. A mistura foi efetuada em almofariz de vidro e as cápsulas produzidas num encapsulador manual. Posteriormente procedeu-se ao controlo que qualidade das cápsulas, sendo analisadas as características organolépticas cor, odor e aspeto, um ensaio de uniformidade de massa das Preparações Apresentadas em Formas Farmacêuticas Unitárias, e ainda uma avaliação da quantidade total de cápsulas e sua conformidade com a quantidade prescrita pelo médico. O preço do medicamento foi calculado tendo em conta o custo das matérias-primas, o referente aos honorários de manipulação e o do material de embalagem, todos eles calculados através do respetivo fator multiplicativo legislado. O P.V.P. final do medicamento manipulado é calculado pela soma das três parcelas atrás referidas, multiplicada por um fator multiplicativo e é acrescido de 6% de IVA (2). Em anexo, apresento a ficha de manipulação destas cápsulas (ver Anexo III).

Pomada de Propionato de clobetasol e ácido salicílico a 5%

O segundo medicamento manipulado que produzi foi uma pomada de Propionato de clobetasol, a partir forma farmacêutica Dermovate pomada (0.5mg/g), já comercializada, e ácido salicílico a 5%.

Nesta pomada, a inclusão da Dermovate pomada deve-se ao proprionato de clobetasol, corticosteroide de uso tópico que está indicado para o tratamento de um estado de hiperqueratose, como o existente na psoríase (3) e o ácido salicílico que, na concentração de 5%, apresenta propriedades queratolíticas, promovendo a dissolução de formações queratínicas e por isso pode ser utilizado no tratamento tópico de quadros de hiperqueratose e descamação da pele (4). Assim, a pomada preparada tem como principal indicação terapêutica o tratamento de uma situação de psoríase. Tal como para as cápsulas, após a preparação desta pomada utilizando um misturador mecânico, procedeu-se ao devido controlo de qualidade e ao cálculo de preço do medicamento manipulado. Em anexo, apresento a ficha de manipulação desta pomada (ver Anexo IV).

2.1.4) Threats (Ameaças)

2.1.4.1) Horas de maior movimento na farmácia

A farmácia Luciano&Matos é uma farmácia com um enorme fluxo de utentes e, naturalmente, havia alturas, principalmente de manhã, em que a farmácia enchia e a fila para atendimento era grande. Havendo apenas 6 balcões de atendimento na farmácia e uma enorme equipa de profissionais e estagiários a exercer essa função, muitas das vezes estavam os balcões todos ocupados. Ao início esta situação deixava-me sem saber como reagir uma vez que havia utentes por atender que percebiam que havia estagiários, como eu, sem nada para fazer. Um dia, na tentativa de saber qual a postura que devemos ter nestas situações, perguntei a um farmacêutico o que poderia fazer, o qual me respondeu que deveria ir ao encontro do utente saber o que procurava e, caso se tratassem de produtos exclusivos de *robot*, conversar um pouco até estar algum balcão disponível para o atendimento, caso houvesse possibilidade, ir buscar os produtos que não são armazenados no *robot*, enquanto aguardava pela disponibilidade de balcão. Outro problema decorrente desta afluência de utentes à farmácia residiu no facto de, quando surgiam dúvidas durante um atendimento e nenhum colaborador estivesse disponível para me poder esclarecer, tornava-se inevitável interromper o atendimento de um colega, que por vezes não era possível de imediato e o utente tinha de aguardar. Por estas duas razões considerei este ponto uma ameaça ao meu

estágio e apesar da primeira ter sido totalmente ultrapassada, a segunda, ainda que com menos frequência, por vezes ainda acontecia no final do estágio.

2.1.4.2) Utentes que não desejavam ser atendidos por estagiários

Por vezes, havia utentes que tinham algum receio em ser atendidos por estagiários. Enquanto alguns recebiam que a pouca experiência que temos fosse insuficiente para lhes dar um aconselhamento adequado e não cediam, de todo, à tentativa de os abordarmos, outros achavam que, como não os conhecíamos, o atendimento ia ser mais demorado, uma vez que não tínhamos conhecimento dos produtos e medicamentos que habitualmente levavam. Estes, quando insistíamos para os atender, rapidamente percebiam que tínhamos acesso às informações relativas aos produtos que costumavam comprar, e ficavam agradados com o nosso atendimento. Considerei este facto uma ameaça ao sucesso do meu estágio uma vez que provocou em mim uma sensação de desconforto, desmotivação e constrangimento. Apesar de tudo, estes utentes representavam uma pequena percentagem dos utentes da farmácia e, em contrapartida, havia utentes que, por saberem que estávamos numa situação de aprendizagem, colocavam-nos à vontade e incentivavam-nos a atendê-los, demorando o tempo necessário para tirarmos todas as dúvidas que nos surgissem durante o atendimento.

2.1.4.3) Medicamentos esgotados

Muitos foram os casos de medicamentos esgotados ou em quota limitada que surgiram durante o período do meu estágio. O facto de um medicamento estar esgotado implica que o utente tenha de tomar uma decisão difícil: ou aguarda pelo retorno do medicamento ao mercado, caso ainda tenha medicação suficiente ou de acordo com a necessidade dessa terapêutica; ou muda de laboratório, quando existem alternativas, comprando um medicamento com uma embalagem diferente da que habitualmente leva, correndo o risco de fazer confusão com as embalagens. Como é de esperar, os utentes não ficam agradados com esta situação uma vez que a falta de um medicamento pode refletir-se num agravamento de um problema de saúde. Apesar de haver medicamentos em quota limitada, que ainda não estavam esgotados, e que são cedidos às farmácias gradualmente, o número de encomendas era muito superior ao número de embalagens que iam chegando, ficando os utentes muito tempo à espera do medicamento que reservaram. A meu ver, esta é uma grande ameaça à credibilidade das farmácias e do SNS de Portugal porque, para o utente, um medicamento tem tanta ou maior importância do que o próprio alimento. É uma necessidade primária que, por alguma razão, deixa de estar ao alcance de quem mais necessita e somos nós, farmacêuticos, que temos de dar a cara perante estas situações e tentar arranjar alternativas.

2.1.4.4) Alteração do P.V.P. dos medicamentos

Ao longo do estágio várias alterações no P.V.P. dos medicamentos sujeitos a receita médica, que são definidos pelo estado, foram efetuadas, e suscitaram conflitos com alguns clientes ao balcão. Perante estas alterações era difícil explicar aos utentes que a alteração de preço dos medicamentos era alheia à gerência da farmácia, assim como o facto de alguns medicamentos deixarem de ser comparticipados. Mais uma vez, os utentes demonstravam o seu desagrado e saber comunicar com eles da forma mais adequada, fazendo-os perceber a situação, não era fácil. A constante alteração de preços não afetava apenas o atendimento aos utentes. Também na receção de encomendas era necessário ter muita atenção a estas alterações e se existem ou não produtos marcados na farmácia com o preço antigo, que precisam de ser escoados num prazo máximo de 60 dias a partir da data de alteração, o que, para produtos com pouca rotação ou com grande quantidade em *stock*, por vezes não é possível.

3. Caso Clínico

Numa tarde, um senhor com cerca de 45 anos, chegou à farmácia e pediu aconselhamento pois sentia que estava a ficar engripado. Queixava-se de, desde à 5 dias atrás, ter começado a espirrar e a ficar com o nariz constantemente entupido e com uma tosse, inicialmente seca, mas que já apresentava expetoração. Queixava-se ainda de ter dor de cabeça. Após ter feito algumas perguntas ao utente, acerca de possíveis problemas de saúde que poderia ter, se tinha febre e/ou dificuldade respiratória, ao qual ele me respondeu negativamente a todas as questões, rapidamente pude perceber que estava perante uma situação de constipação, que reunia todas as condições para um tratamento de indicação farmacêutica. Assim, recomendei-lhe Bisolvon® Linctus adulto, MNSRM cuja molécula ativa é Cloridrato de Bromexina, um adjuvante mucolítico que iria fluidificar as secreções, numa posologia de 5ml 3 vezes por dia (5). Reforcei que para o efeito do xarope ser mais notório, era essencial beber muita água ao longo do dia para tornar a expetoração mais fluida. Recomendei também a toma de Antigrippine Trieffect, um MNSRM com paracetamol (composto com ação analgésica e antipirética) e cloridrato de fenilefrina (substância descongestionante nasal), numa posologia de 2 comprimidos 3 vezes por dia (6). Como medidas não farmacológicas indiquei, para além da ingestão de água, evitar ambientes poluídos e muito populados, andar agasalhado, praticar uma dieta equilibrada e repouso.

Referi ainda que se no espaço de uma semana os sintomas não melhorassem ou piorassem, deveria consultar um médico.

4. Conclusão

O estágio em Farmácia Comunitária foi o ponto mais alto de todo o meu percurso académico. Foi o momento em que pude colocar em prática e testar todos os conhecimentos que adquiri ao longo do curso e aprender a aplicá-los da melhor forma. O facto de ter feito o estágio na Farmácia Luciano&Matos, que já conhecia de um estágio de Verão, para mim foi uma mais-valia porque sinto que ganhei imensos conhecimentos e apetências pessoais que antes não tinha, e tudo graças à fantástica equipa que me acompanhou.

Após estes 4 meses de aprendizagem intensa, saio da farmácia com a ambição de querer aprender muito mais, para poder ajudar os utentes com que me irei cruzar de futuro, e com a certeza de que darei o meu melhor para ser uma excelente profissional.

Referências Bibliográficas

(1) Luciano&Matos, Farmácia - **Manual de Acolhimento**. 2016.

(2) INFARMED – **Legislação Farmacêutica Compilada**, Portaria n.º 769/2004, de 1 de Julho (acedido a 07/04/2017). Disponível na Internet: http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/portaria_769-2004.pdf/a0b1c512-ac77-42d4-9b06-8b1f3da9fb4d

(3) INFARMED – **Resumo das Características do Medicamento**, Dermovate 0.5mg/g pomada (acedido a 18/04/2017). Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=2453&tipo_doc=rcm

(4) ANF- **Formulário Galénico Português**, Parte II-A.I.I. – Medicamentos utilizados em Dermatologia, Pomadas de Ácido Salicílico a 1%, 2%, 5%, 10% ou 20%. 2001.

(5) INFARMED – **Resumo das Características do Medicamento**, Bisolvon Linctus adulto (acedido a 16/02/2017). Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=36696&tipo_doc=rcm

(6) INFARMED – **Resumo das Características do Medicamento**, Antigrippine Trieffect (acedido a 16/02/2017). Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=54361&tipo_doc=rcm

Anexo I – Exemplo de um protocolo de aconselhamento (I/6)



FARMÁCIAS HOLON
um dia todas serão assim

PROTOCOLO DE ACONSELHAMENTO CONGESTÃO NASAL

ENQUADRAMENTO

A **congestão nasal** é um sintoma que na maioria das vezes está associado a outras patologias, tais como a constipação, a gripe, a rinite alérgica ou a sinusite. O processo é normalmente desencadeado pela inalação de um alérgeno ou partícula vírica que estimula o sistema imunitário e promove a libertação de mediadores inflamatórios. Estes mediadores inflamatórios induzem congestão nasal por aumento do fluxo sanguíneo (hiperemia) e aumento da permeabilidade capilar com extravasamento de fluidos para o espaço intersticial, além de outras reações locais como o aumento da secreção glandular (rinorreia) e irritação da mucosa. (1-6)

A abordagem das queixas de congestão nasal deve ser feita tendo em conta a sintomatologia que a acompanha, de forma a permitir uma avaliação diferencial (Tabela 1).

Tabela 1 | Principais causas de congestão nasal e respetiva avaliação diferencial.

AValiação Diferencial	Características
Constipação	Geralmente de origem viral, sendo o <i>rinovírus</i> responsável por grande parte dos casos, que têm uma duração de 1 a 2 semanas; (2) Sintomas: garganta irritada, espirros, rinorreia, alternando com congestão nasal (as secreções límpidas iniciais tornam-se, progressivamente, purulentas), disfonia (rouquidão) ou afonia, febre baixa (até 38,5 °C e particularmente nas crianças), dor de cabeça e mal-estar geral, tosse não produtiva (com início no 3º ou 4º dia), que se torna progressivamente produtiva (2,3,7)
Rinite Alérgica	Doença nasal sintomática, determinada por um processo inflamatório mediado pela IgE após exposição da mucosa nasal a um ou mais alérgenos;(8) Sintomas: rinorreia aquosa, congestão nasal, espirros sucessivos, prurido no nariz e/ou no palato, envolvimento ocular (olhos vermelhos e inchados, lacrimejo, comichão), perturbações do sono e fadiga (6,9)
Rinite Não Alérgica	Os agentes etiológicos da Rinite Não Alérgica são variados: <ul style="list-style-type: none">• De origem infecciosa;• Fatores Externos: fumo, perfumes, mudanças climáticas, álcool, picante e stress - rinite vasomotora;• Medicamentos: IECAs, Beta Bloqueadores, AINEs, descongestionantes nasais usados em excesso (efeito <i>rebound</i>) - rinite medicamentosa;• Desequilíbrio Hormonal: gravidez (rinite gravídica), puberdade, terapêutica hormonal, perturbações endócrinas (ex. hipotireoidismo) ou hipertrofia das adenoides. Sintomas: rinorreia, congestão nasal e, por vezes, dor de cabeça. (1)

IMP-75 SV8
23/08/2016

Protocolo de Aconselhamento | Congestão Nasal

Anexo I – Exemplo de um protocolo de aconselhamento (2/6)

Tabela 1 | Principais causas de congestão nasal e respetiva avaliação diferencial. (Cont.)

AValiação Diferencial	Características
Sinusite	Inflamação da mucosa que reveste as paredes dos seios perinasais, geralmente de origem infecciosa;(10) ou originada pelo edema resultante das alergias ou pólipos;(11) Sintomas: congestão nasal, rinorreia, mal-estar geral, dor facial, por vezes febre e dor de cabeça difusa. As secreções podem ser espessas, com cor amarelada ou verde. (10,11)

O nariz recebe estimulação colinérgica, que causa vasodilatação e aumento da secreção glandular, e estimulação simpática que provoca vasoconstricção.(11) A sintomatologia pode ser aliviada com recurso a descongestionantes nasais, sistémicos ou tópicos, que são aminas simpaticomiméticas que estimulam os recetores alfa dos vasos sanguíneos nasais, provocando vasoconstricção com diminuição do fluxo sanguíneo ao nível da área nasal, diminuição do edema nasal, aumento da drenagem e ventilação local, e diminuição da sensação de nariz entupido.(12)

Questões a colocar ao utente para avaliação da situação

- Há quanto tempo está congestionado?
- Tem mais algum sintoma?
- Tem dificuldade em respirar?
- Já usou algum descongestionante nasal ou tomou alguma outra medida terapêutica? Qual? Resultou?
- Esta situação ocorre-lhe com alguma frequência? Se sim, em que situações?
- Sofre de alguma doença respiratória (ex: asma, rinite alérgica, sinusite)?
- Associa o início da rinorreia a algum traumatismo nasal?
- Está grávida?
- Tem alguma outra doença que esteja a tratar ou encontra-se a fazer algum tipo de medicação?

Situações que requerem encaminhamento para nível 2 de intervenção ou referenciação para consulta médica

- Utente com idade inferior a 2 anos;
- O profissional suspeite de outra causa que não constipação ou rinite alérgica;
- O utente apresente congestão nasal persistente;
- Utente apresente dificuldade respiratória;
- A congestão nasal seja acompanhada de dor de ouvidos ou choro insistente (em crianças);
- Subsista a percepção do profissional de que pela intervenção prevista: o problema não se atenuará; outras patologias associadas se possam agravar; se pode alterar negativamente a efetividade e/ou segurança da medicação atual.(5)

Anexo I – Exemplo de um protocolo de aconselhamento (3/6)



FARMÁCIAS HOLON
um dia todas serão assim

TRATAMENTO

Farmacológico

Descongestionantes nasais tópicos

Têm como vantagem um efeito mais rápido e menores efeitos adversos.

O tempo de tratamento **não deve exceder 3-5 dias**, devido ao risco aumentado de irritação local, tolerância ou taquifilaxia, ou ainda o desenvolvimento de rinite medicamentosa devido ao efeito *rebound* (exacerbação da congestão).^(1,2,13)

Deve ter-se em atenção a **técnica de aplicação dos descongestionantes tópicos**, principalmente no caso das gotas, para impedir a deglutição da solução e a ocorrência de efeitos sistémicos. Seja qual for o dispositivo utilizado, o utente deve sempre proceder à lavagem das fossas nasais antes da aplicação (através do uso de uma solução isotónica de água do mar ou soro fisiológico ou assoar).

No caso das **gotas** o utente deve reclinar a cabeça para trás, rodar a cabeça lentamente para ambos os lados para permitir que a solução se espalhe na mucosa e permanecer nesta posição alguns minutos após a aplicação do medicamento. No caso do **nebulizador** deve manter-se a cabeça direita e inspirar simultaneamente com a aplicação do medicamento. O aplicador deve ser retirado da narina antes de aliviar a pressão e permitir a entrada do ar para minimizar a contaminação com as secreções nasais. O uso do mesmo produto por mais de uma pessoa contribui para a transmissão da infeção, pelo que se deve recomendar a identificação da embalagem com o nome do utente.^(12,14)

Descongestionantes nasais sistémicos

Têm maior duração de ação, não provocam irritação local nem rinite medicamentosa, mas podem provocar maiores efeitos adversos. O tratamento recorrendo a descongestionantes nasais sistémicos **não deve exceder os 7 dias**. Este tipo de descongestionantes, podem diminuir a tolerância à glucose e aumentar a pressão arterial, pelo que não devem ser aconselhados a pessoas diabéticas nem a pessoas com hipertensão⁽⁹⁾. Podem ainda, aumentar a pressão interocular, sendo por isso desaconselhados a utentes diagnosticados com glaucoma.⁽¹⁵⁾ As grávidas não devem usar descongestionantes sistémicos, pois pode baixar o fluxo sanguíneo do feto.⁽⁷⁾

- As **soluções salinas de lavagem nasal** hidratam as mucosas e as secreções secas, facilitando a sua remoção. Podem ser usadas antes da aplicação dos *sprays* medicamentosos para potenciar o efeito dos mesmos. ⁽⁹⁾
- Na eventualidade do utente apresentar congestão nasal continuada, recomendar apenas soluções salinas e tiras nasais de forma a diminuir a utilização de descongestionantes e evitar o efeito *rebound*.⁽¹²⁾
- Quando a congestão nasal está associada a cefaleias ou dor facial, pode recomendar-se a associação paracetamol (ou AINE) + descongestionante. ⁽⁷⁾

IMP755 v3
23/06/2016

Protocolo de Aconselhamento | Congestão Nasal

1

Anexo I – Exemplo de um protocolo de aconselhamento (4/6)



FARMÁCIAS HOLON
um dia todas serão assim

Não Farmacológico

- Beber muitos líquidos, humidificar o ambiente, evitar o álcool, a cafeína e o tabaco;
- Os aspiradores nasais são úteis na remoção das secreções nasais nas crianças de idade inferior a 2 anos;
- Evitar assoar com demasiada força (risco de disseminação da infeção para o ouvido);
- Utilização de tiras nasais;
- Repouso.(7)

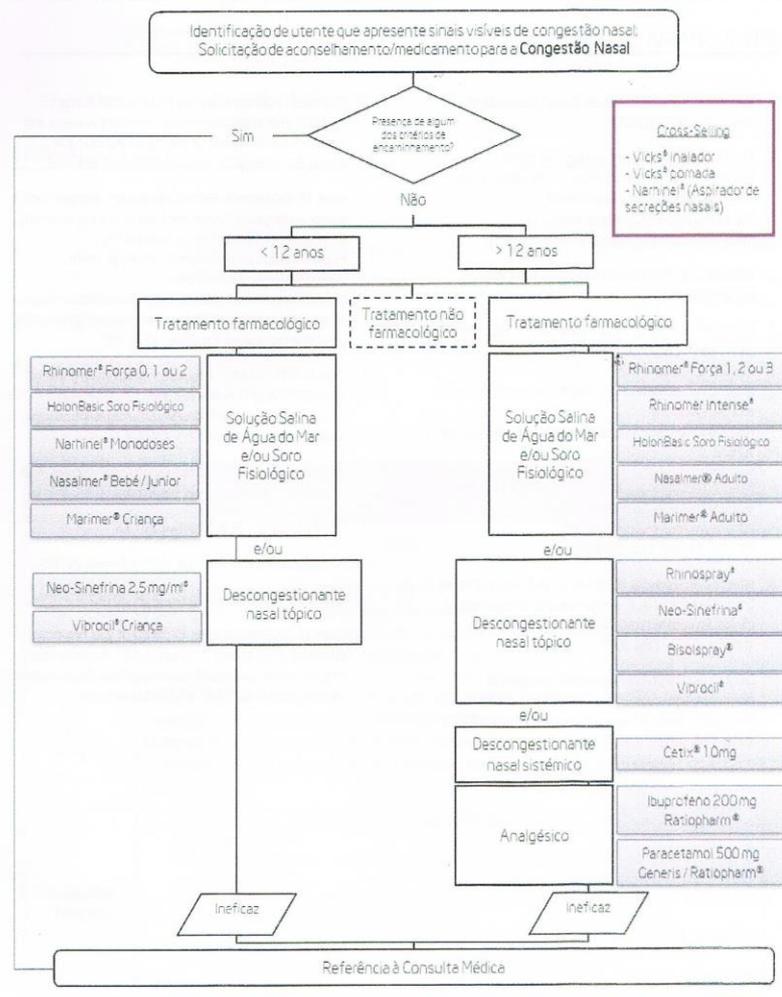
IMP755 v3
23/09/2016

Protocolo de Aconselhamento | Congestão Nasal

4

Anexo I – Exemplo de um protocolo de aconselhamento (5/6)

FLUXOGRAMA DE ACONSELHAMENTO



Anexo I – Exemplo de um protocolo de aconselhamento (6/6)



FARMÁCIAS HOLON

um dia todas serão assim

BIBLIOGRAFIA

1. Buczyko K. Non-allergic rhinitis. *Postep Dermatologii i Alergol.* 2009;26(5):359-71.
2. Kim SY, Chang Y-J, Cho HM, Hwang Y-W, Moon YS. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for the common cold. *Cochrane database Syst Rev* [Internet]. 2015;(9):CD006362. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26387658>
3. Kirkpatrick GL. The common cold. *Prim Care.* 1996 Dec;23(4):657-75.
4. McClain MT, Sexton DJ. Patient information : The common cold in adults (Beyond the Basics) Authors [Internet]. 2016. p. 5. Available from: http://www.uptodate.com/contents/the-common-cold-in-adults-beyond-the-basics?source=search_result&search=cold&selectedTitle=1%7E22
5. NHS T. The Common Cold - NHS [Internet]. 2015 [cited 2016 Aug 2]. p. 1-12. Available from: <http://www.nhs.uk/Conditions/Cold-common/Pages/Introduction.aspx>
6. Wallace D V, Dykewicz MS, Bernstein DI, Blessing-Moore J, Cox L, Khan DA, et al. The diagnosis and management of rhinitis: An updated practice parameter. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(2 SUPPL):1-84.
7. Dlugosz CK. The practitioner's quick reference to nonprescription drugs. 2nd ed. American Pharmacists Association, editor. American Pharmacists Association; 2012. 198-200 p.
8. Bousquet J, Fokkens W, Burney P, Durham SR, Bachert C, Akdis CA, et al. Important research questions in allergy and related diseases: Nonallergic rhinitis: A GA2LEN paper. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2008;63(7):842-53.
9. Kemp SF, DeShazo RD. Patient information : Allergic rhinitis (seasonal allergies) (Beyond the Basics) Authors [Internet]. 2016 [cited 2016 Aug 1]. p. 8. Available from: http://www.uptodate.com/contents/allergic-rhinitis-seasonal-allergies-beyond-the-basics?source=search_result&search=Patient+information%3A+Allergic+rhinitis+%2Bseasonal+allergies%29+%2BBeyond+the+Basics&selectedTitle=1%7E150
10. Choices NHS. Sinusitis - information prescription [Internet]. [cited 2016 Aug 1]. Available from: <http://www.nhs.uk/conditions/Sinusitis/Pages/Introduction.aspx>
11. Seeley RR, Stephens TT, Tate P. *Anatomia & Fisiologia.* 8th ed. Lusociência, Companies M-GH, editors. 2008.
12. Novartis. Vibrocil - RCM. *Infarmed.* 2013;5.
13. Portuguesa OP. Neo- Sinefrina - RCM. *Infarmed.* 2016;5.
14. Boehringer Ingelheim. Biso spray -RCM. 2014;7.
15. Cov S. NHS Choices puts you in control of your healthcare [Internet]. 2002 [cited 2016 Aug 1]. p. 21. Available from: <http://www.nhs.uk/Pages/Preview.aspx?site=Decongestant-drugs&print=636056641477827504&Script=0>

Anexo II – Exemplo de uma instrução de trabalho

Determinar a Bioimpedância



1º LIGAR A
BALANÇA



2º LEVANTAR A
PARTE AMOVIVEL
DA BALANÇA



3º CARREGAR NA
TECLA "GUEST"



4º USAR AS TECLAS
"SET" E SETAS PARA
INSERIR IDADE



5º USAR "SET" E SETAS
PARA INSERIR ALTURA



6º USAR "SET" E
SETAS PARA INSERIR
GÉNERO



7º AGUARDAR QUE
FIQUE A PISCAR O PESO



8º PEDIR AO CLIENTE PARA
SUBIR PARA A BALANÇA
DESCALÇO



9º PEDIR AO CLIENTE QUE
SEGURE FIRMEMENTE OS
MANIPULOS DA BALANÇA



11º AGUARDAR A DETERMINAÇÃO DOS
PARAMETROS



12º LER OS RESULTADOS PERCORRENDO AS TECLAS DE
CADA PARAMETRO



Anexo III – Ficha de manipulação das cápsulas (1/5)



FARMÁCIA
LUCIANO & MATOS

Ficha de manipulação de cápsulas

UTENTE: MORADA: MÉDICO PRESCRITOR: OPERADOR: MODO DE CONSERVAÇÃO:

LOTE: DATA: VALIDADE: VIA DE ADMINISTRAÇÃO:

CP-13917
07-04-2017
6 meses
Oral

Cátia Sequeira
Conservar à temperatura ambiente, no frasco bem fechado e ao abrigo da luz.

MATÉRIAS PRIMAS:

MATÉRIA PRIMA	LOTE	ORIGEM	P.UNITÁRIO (€/g)	QUANTIDADE (g)	FACTOR (x)	CUSTO (€)
Ácido fólico	160101-G-1	Acofarma	0,372400			0,00 €
Bitartarato de colina	7295/13/1	FarmaQuímica	0,036160			0,00 €
Biotina	161673-J-2	Acofarma	2,150200			0,00 €
Cafeína	161218-O-1	Acofarma	0,024200			0,00 €
Carboximetilcelulose	161251-P-2	Acofarma	0,016500			0,00 €
Clordiazpóxido HCl	LH0729A	Jaba Recordati	0,041167			0,00 €
Cloreto Potássio	14104-B06	Fagron Iberica	0,022240			0,00 €
Dapsona	141554-I-3	Acofarma	1,239200			0,00 €
Espirulina	141893-P-4	Acofarma	0,038820			0,00 €
Ext. Alcachofra	160890	Acofarma	0,071400			0,00 €
Ext. Boldo	160758-P-2	Acofarma	0,076510	4,50	2,20	0,76 €
Ext. Castanheiro da Índia	160528-G-2	Acofarma	0,202000			0,00 €
Ext. Cascara Sagrada	161487-N-1	Acofarma	0,149440	3,60	2,20	1,18 €
Ext. Centelha Asiática	160617-P-2	Acofarma	0,103430	13,50	1,90	2,65 €
Ext. Chá Verde	120858-I-1	Acofarma	0,120200			0,00 €
Ext. Equisetum	160930-J-1	Acofarma	0,091000			0,00 €
Ext. Hoodia Gordonii	151097-I-1	Acofarma	0,511600			0,00 €
Ext. Laranja Amarga	150923-P-1	Acofarma	0,047180			0,00 €
Ext. Garcinia Cambogia	160584-N-2	Acofarma	0,062000			0,00 €
Ext. Senne (pó)	C18-H05-00630	Fagron Iberica	0,206360			0,00 €
Ext. Fucus	151855-N-1	Acofarma	0,048720			0,00 €
Excipiente cápsulas	429-T34-036469	Fagron Iberica	0,029250			0,00 €
Fenofaleína	161827-J-1	Acofarma	0,209500			0,00 €
Furosemida	06-B01_286556	Fagron Iberica	0,209300			0,00 €
Glucomanano	160447-P-3	Acofarma	0,031090			0,00 €
Gluconato de zinco	161353-N-2	Acofarma	0,071520			0,00 €
Hidroclorotiazida	151842-G-4	Acofarma	0,340000			0,00 €
5-HTP (oxitriptano)	L14060074	Fagron Iberica	3,500000			0,00 €
Ivermectina Uso Humano	160855-D-4	Acofarma	25,200000			0,00 €
L-Carnitina tartrato	161253-P-1	Acofarma	0,070950			0,00 €
Metformina	160358-N-1	Acofarma	0,046120			0,00 €
Picolinato de crómio	160799-D-2	Acofarma	7,210000			0,00 €
Riboflavina	161986-J-1	Acofarma	0,149900			0,00 €
Ext. Caralluma fimbriata	150730-J-1	Acofarma	0,222100			0,00 €
Silimarina	L14030091	Fagron Iberica	0,289900			0,00 €
Topiramato	16038816	Ratiopharm	0,118333			0,00 €
Vitamina C	160713-J-1	Acofarma	0,045300			0,00 €
Cápsulas verde-verde n° 00	150040-CB-4	Acofarma	0,112733			0,00 €
Cáps amarelo-laranja n° 00	161063-CB-2	Acofarma	0,115267			0,00 €
Cápsulas vermelhas n° 3	161732-CB-1	Acofarma	0,166898			0,00 €
Cápsulas branco-laranja n° 4	160899-CA-3	Acofarma	0,347213	5,49	2,20	4,19 €
Cápsulas verdes n° 1	141300-CA-2	Acofarma	0,131899			0,00 €
0	0	0	0,000000			0,00 €

TOTAL MATÉRIA PRIMA (A) 8,79 €

Rubrica do Supervisor

Anexo III – Ficha de manipulação das cápsulas (2/5)



Ficha de manipulação de cápsulas

CONTROLO DE QUALIDADE:

Ensaio	Especificação	Resultado		Rubrica do operador
		Conforme	Não conforme	
1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS				
1.1 Cor Verificar conformidade com a especificação	Pó castanho	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
1.2 Odor Verificar conformidade com a especificação	Característico do Boldo	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
1.3 Aspecto Verificar conformidade com a especificação	Pó com aspecto homogéneo	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
2. CONFORMIDADE COM A DEFINIÇÃO DA MONOGRAFIA "CÁPSULAS" DA F.P.VII	Texto "2.9.5. Uniformidade de Massa das Preparações Apresentadas em Formas Farmacéuticas Unitárias" (F.P.VII, 1º Volume, Cap. Geral 2, 2.9 Métodos de Farmacotecnia)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
3. QUANTIDADE Contar as cápsulas preparadas	90 cápsulas (quantidade prescrita)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<p>Aprovado <input checked="" type="checkbox"/> Rejeitado <input type="checkbox"/></p> <p>Supervisor Data 07-04-2017</p>				

ANOTAÇÕES:

Anexo III – Ficha de manipulação das cápsulas (3/5) e (4/5)

07/04/2017

Farmácia Luciano & Matos
ARMACIA
 Maria Helena Costa Neves Estrada, 42
 Praça S. do Mar, 40 - 42 - 1099-103 Lisboa
 Telef: 2136221478 - Fax: 2136221477

Lote n.º CP - 13917 **Data:** 07/04/2017 **Preço:** 46,54€

Utente:

Médico:

Composição: Cáscara sagrada - 40 mg
 Boldo - 50 mg
 Centella asiática - 150 mg

Posologia: Tomar segundo indicação médica.

Quantidade: 90 cápsulas Medicamento para administração oral

Conservar à temperatura ambiente, no frasco bem fechado e ao abrigo da luz.
 Manter afastado das crianças. Prazo de utilização: 6 meses

Receita Médica N.º

GOVERNO DE PORTUGAL
 Ministério da Saúde

RECEITA MANUAL
 Exceção legal:

a) Falência informática
 b) Inadaptação do prescriptor
 c) Prescrição no domicílio
 d) Até 40 receitas/mês

Intente: _____ R. C.: _____
 N.º de Utente: _____
 Telefone: _____
 Entidade Responsável: _____
 N.º de Beneficiário: _____

Especialidade: _____
 Telefone: _____
 Vinheta do Local de Prescrição

R.	DCI/Nome, dosagem, forma farmacéutica, embalagem	N.º	Extensão
1	F.S.A. p/ 1 cáps. (manipulado)		
	40,25 Hidroclorotiazida mg	CP- 13817	0,280
	Furosemida mg		
Posologia	Cloreto de potássio mg	440729A	0,302g
	Clordiazepóxido mg		
2	Diazepam mg	mande	
	Espirulina 30 mg	90	
	Carboximetilcelulose 80 mg	90	0,324g
Posologia	Glucomanano 80 mg	cáps.	
	excipiente 30 up		
3	F.S.A. p/ 1 cáps. (manipulado)		
	0,54 e Cascara sagrada 40 mg	CP-13917	
	Senne (pó) mg		
	Fenoltaleína mg	u=2 b. nyc - S. r. u. u.	
Posologia	Boldo 50 mg		
4	Fucus vesic. mg	mande	
	Centella Aziática 150 mg	90	
	L-Carnitina mg		
	Cafeína mg	cáps.	
Posologia			
Validade:	30 dias		
Data:	2017.3.30		
	(aaaa/mm/aa)		(assinatura do Médico prescriptor)

Anexo III – Ficha de manipulação das cápsulas (5/5)



Ficha de manipulação de cápsulas

MANIPULAÇÃO:

	Forma Farmacêutica	Quantidade	F (€)	Factor multiplicativo	Valor (€)
Valor referente à quantidade base	Cápsulas	50	4,92 €	4,5	22,14 €
Valor adicional	Cápsulas	40	4,92 €	0,01	1,97 €
TOTAL DA MANIPULAÇÃO (B)					24,11 €

MATERIAL DE EMBALAGEM:

Material de embalagem	Preço de aquisição (€)	Quantidade	Factor multiplicativo	Valor (€)
Frasco 100ml	0,72 €	1	1,2	0,86 €
Lote: 110816				
TOTAL DE MATERIAL DE EMBALAGEM (C)				0,87 €

P.V.P. DO MEDICAMENTO MANIPULADO:

Soma de: (A) + (B) + (C)	Factor multiplicativo	Valor (€)
33,77 €	1,3	43,90 €
		+ IVA (6%) 2,64 €
		P.V.P. = 46,54 €

Operador:

Supervisor:

FEITO SEQUUNDO A ARTE

Anexo IV – Ficha de manipulação da pomada (1/6)

 FARMÁCIA LUCIANO & MATOS	Ficha de preparação de medicamentos manipulados
--	--

Medicamento: Propionato de clobetasol – 30 mg; Ácido salicílico – 5g;
Vaselina q.b.p. 100g

Teor em substância(s) activa(s); 100g (ml ou unidades) contém _____ g (ml) de _____

Forma farmacêutica: pomada

Data de preparação: 18/04/2017

Número de lote: 4617

Quantidade a preparar: 100g

Matérias-primas	Nº de lote	Origem	Farmacopeia	Quantidade para 100g	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Rubrica do operador	Rubrica do supervisor
Dermovate [®] pomad (0.5mg/g)	C794925	GSK	<i>Validade 12/2018</i>	60 g	60g	59,989g		
Ácido salicílico	131136-O-1	Acofarma	Ph.Eur. 7	5g	5g	5,000g		
Vaselina branca	161740-P-1	Acofarma	Ph.Eur. 8.8	q.b.p. 100g	q.b.p. 100g	35,002g		

Preparação

1. Verificar o estado de limpeza do material.		
2. Descondicionar as 2 bisnagas de Dermovate [®] pomada e colocar diretamente no recipiente unguator.		
3. Pesar o ácido salicílico e adicionar ao recipiente unguator.		
4. Adicionar a vaselina sólida diretamente para o recipiente unguator até perfazer o peso final de 100 g.		
5. Executar a mistura no Unguator.		
6. Fechar o recipiente e rotular.		
7. Lavar e secar o material utilizado.		
8. _____		
9. _____		
10. _____		
11. _____		

Anexo IV – Ficha de manipulação da pomada (3/6) e (4/6)

farmácia Luciano & Matos
farmácia
 Divisão Farmácia de
 Maria Helena Costa Neves Correia Amado
 Praça 8 de Maio, 40 - 42 - 1000-300 Coimbra
 Telef. 239.873.1125 - Fax: 239.82.3111

Lote nº 4617 Data: 18/04/2017 Preço: 30,92€

Utente: Médico:

Propionato de clobetasol – 30 mg
 (Dermovate® pomada)
 Ácido salicílico – 5 g
 Vaselina sólida q.b.p. 100g

Posologia: Aplicar à noite nas lesões.
 Medicamento para aplicação cutânea. Manter fora da alcance das crianças
 Conservar à temperatura ambiente, no recipiente bem fechado e ao abrigo da luz.
 Pode utilizar até: 18/05/2017 Use externo

8
 28/04/17



Receita Médica Nº

Utente: Telefone: R.C.: Entidade Responsável: SNS Nº de Beneficiário	MM																									
Especialidade: Telefone:																										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 5%; text-align: center;">R_x</th> <th style="width: 55%;">DCI / Nome, dosagem, forma farmacêutica, embalagem, posologia</th> <th style="width: 10%;">Nº</th> <th style="width: 10%;">Extensão</th> <th style="width: 20%;">Identificação Ótica</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td>Manipulado: ácido salicílico 5 gramas; propionato de clobetasol 30 mg, Vaselina qbp 100 gramas. FSA e Mand Posologia - Aplicar à noite nas lesões</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td></td> <td>Uma</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">2</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">3</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">4</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		R _x	DCI / Nome, dosagem, forma farmacêutica, embalagem, posologia	Nº	Extensão	Identificação Ótica	1	Manipulado: ácido salicílico 5 gramas; propionato de clobetasol 30 mg, Vaselina qbp 100 gramas. FSA e Mand Posologia - Aplicar à noite nas lesões	1		Uma	2					3					4				
R _x	DCI / Nome, dosagem, forma farmacêutica, embalagem, posologia	Nº	Extensão	Identificação Ótica																						
1	Manipulado: ácido salicílico 5 gramas; propionato de clobetasol 30 mg, Vaselina qbp 100 gramas. FSA e Mand Posologia - Aplicar à noite nas lesões	1		Uma																						
2																										
3																										
4																										
Validade: 30 DIAS Data: 2017-04-13	(assinatura do Médico Prescritor)																									

Processado por computador - Client for prescription, versão 6.0 - ClinTri-15

Anexo IV – Ficha de manipulação da pomada (5/6)

 FARMÁCIA LUCIANO & MATOS	Ficha de preparação de medicamentos manipulados
--	--

Verificação

ENSAIO	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO	Rubrica do operador
Cor	Branca	CONFORME	
Odor	Sem alteração	CONFORME	
Aspecto	Homogéneo	CONFORME	
Quantidade	100g ± 5%	CONFORME	

Aprovado Rejeitado

Supervisor:  18/04/2017

Nome e morada do doente

Luciano José dos Santos Ferreira (Pedrosa)

Nome do prescriptor

Dr. Hugo Oliveira

Anotações

Utilizámos Dermovate pomada para obter o propionato de clobetasol por indicação do médico prescriptor.

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Lista de Abreviaturas

API – *Active Pharmaceutical Ingredient*

AR – Assuntos Regulamentares

BA – Boletim Analítico

CEP – Controlo em Processo

CQ – Controlo de Qualidade

DUL – Documento Único Laboratorial

EPI – Equipamento de Proteção Individual

GQ – Garantia de Qualidade

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

ID – Investigação e Desenvolvimento

IF – Indústria Farmacêutica

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MP – Matérias-Primas

OOS – *Out Of Specification*

PA – Produto-Acabado

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Oportunities, Threats*

I. Introdução

A Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra proporciona aos alunos vagas para estágio em áreas das Ciências Farmacêuticas, para além de Farmácia Comunitária e Farmácia Hospitalar. Uma dessas áreas é a Indústria Farmacêutica, onde realizei o meu segundo estágio, durante três meses (Maio, Junho e Julho), no departamento de Controlo de Qualidade da Farmalabor, em Condeixa-a-Nova, sob orientação da responsável da secção do Controlo de Qualidade, Dr.^a Carla Cristina Albano Dias Paiva.

O estágio Indústria Farmacêutica tem carácter opcional e o que me fez querer experimentar esta área foi o facto de poder perceber todo o ciclo de vida de um medicamento, desde a sua produção, até este estar apto a entrar no mercado e a forma como são garantidas a qualidade e segurança do mesmo. Dado que sempre gostei imenso de laboratório e, para mim, era importante saber como se procedia à avaliação da qualidade do medicamento e outros produtos de saúde e bem-estar, decidi escolher estagiar no departamento de CQ.

A Farmalabor é uma unidade industrial que pertence ao Grupo Medinfar e trabalha em regime de *contract manufacturing*, isto é, por terceirização. Nela fabricam-se produtos farmacêuticos, cosméticos e suplementos alimentares, em formulações sólidas, líquidas e pastosas não-estéreis, para um universo de clientes, tanto nacionais como internacionais, entre os quais o grupo Medinfar (I). Para além da certificação em Boas Práticas de Fabrico, a Farmalabor é uma empresa certificada pelas normas ISO9001 (Qualidade), ISO14001 (Ambiente) e OHSAS18001 (Segurança e Saúde do Trabalho), garantindo assim, a todos os seus clientes e trabalhadores, qualidade e segurança, com a preservação do ambiente.

Neste relatório irei apresentar uma análise *SWOT* do meu estágio em Indústria Farmacêutica, onde analiso todos os pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças que considere pertinentes ao longo deste período.

2. Análise SWOT

Na seguinte tabela apresento, de forma esquematizada, a análise *SWOT* do meu estágio no CQ da Farmalabor, onde podemos encontrar os aspetos positivos na coluna da esquerda e os aspetos negativos na coluna da direita enquanto na metade superior se encontram os fatores de origem interna e na metade inferior, os de origem externa.

Tabela I – Resumo da Análise SWOT"

FORÇAS	FRAQUEZAS
<ol style="list-style-type: none">1) Organização do estágio2) Equipa do CQ3) Segurança no laboratório4) Conhecimentos teóricos e práticos5) Desenvolvimento de competências pessoais6) Procedimentos de utilização de equipamentos	<ol style="list-style-type: none">1) Poucas formações complementares2) Falta de experiência profissional3) Não ter tido oportunidade de estagiar nas outras áreas do CQ4) Curta duração do estágio
OPORTUNIDADES	AMEAÇAS
<ol style="list-style-type: none">1) Área em grande crescimento2) Auditorias3) Perceção da dinâmica das análises	<ol style="list-style-type: none">1) Poucos farmacêuticos a integrar a equipa2) Manuseamento de produtos perigosos

2.1 Análise SWOT – análise crítica

2.1.1) Strengths (Forças)

2.1.1.1) Organização do estágio

O estágio no CQ da Farmalabor, a meu ver, esteve bastante bem organizado. No primeiro dia de estágio foi-me apresentada a Farmalabor, pela Diretora Técnica da unidade industrial, Dr.^a Sónia Heleno e assisti a uma formação acerca das regras de segurança no laboratório, pela Dr.^a Paula Alírio. Ao longo da primeira semana tive de ler procedimentos internos da Farmalabor para me instruir acerca do funcionamento da empresa e boas práticas de laboratório, particularmente importantes para o trabalho que viria a exercer. Após esta etapa inicial fui inserida no grupo de análise de Matérias-Primas onde aprendi, primeiramente, a executar técnicas mais simples e menos exigentes, como identificações por

ultravioleta ou leitura de pontos de fusão e, mais tarde, técnicas que exigiam alguma prática, como doseamentos. Numa última etapa do estágio acompanhei o grupo de análise de Produto Acabado, onde aprendi a executar de forma independente grande parte dos ensaios, com exceção de técnicas de *HPLC* que, pela sua complexidade, exigiam grande destreza do analista. Durante o estágio tive também a possibilidade de acompanhar as atividades realizadas no laboratório da microbiologia, durante um dia, e o Controlo em Processo, durante outro dia, que foi dividido entre o CEP de formas líquidas e pastosas e embalagem e o CEP de formas sólidas.

2.1.1.2) Equipa do CQ

Toda a equipa do CQ da Farmalabor foi determinante para o sucesso do meu estágio. Desde o primeiro dia que fui recebida na Farmalabor num ambiente familiar, de pessoas preocupadas na minha integração e sempre muito prestáveis para me auxiliar no que precisa-se. Esta equipa a que me refiro é liderada pela Dr.^a Carla Cristina Albano Dias Paiva, diretora da secção, e composta pela Eng.^a Olga Santos, Eng.^a Ana Silva e Eng.^a Cidália Fernandes, por Patrícia Jesus, pelos técnicos analistas das MP Isabel Querido, Elisabete Ribeiro, Daniela Marques e Cátia Pinto, pelos analistas do PA Ana Sargento, Eduardo Branco, Isabel Travasso e Carlos Santana e pela responsável da limpeza de todo o material de laboratório, Berta Batista. Todos eles me acompanharam ao longo do estágio, e sempre me transmitiram os seus conhecimentos da melhor forma, de modo a que pudesse crescer a nível profissional como futura farmacêutica que serei e, quem sabe, futura analista de um laboratório de uma IF. A esta equipa também pertencem os colaboradores do laboratório de microbiologia e do CEP, com os quais contactei menos tempo, mas que igualmente demonstraram prontidão para me ensinar os seus conhecimentos, e os analistas do material de embalagem.

2.1.1.3) Segurança no laboratório

No primeiro dia de estágio assisti a uma pequena formação sobre regras de higiene e segurança no laboratório. Sempre soube da existência destas regras num local de trabalho e vê-las implementadas e presentes todos os dias no laboratório fez-me perceber a sua importância quer ao nível da proteção do colaborador, quer para evitar a contaminação dos produtos. No final desta formação foram-me cedidos os EPIs que teria de utilizar ao longo do estágio, nas situações que assim o exigissem: uma máscara buconasal com filtros de vapores e filtros para pós e uns óculos de laboratório, de uso obrigatório na sala de ensaios químicos. Foi-me também ensinado o local, no laboratório, onde poderia encontrar luvas, máscaras descartáveis e tampões para os ouvidos, obrigatórios aquando do manuseamento do equipamento de batimentos para o ensaio de Densidade Aparente de Pós, e o local onde

estão localizados os extintores, a caixa de primeiros socorros, o chuveiro e o lava-olhos a utilizar em caso de emergência.

No laboratório de ensaios químicos, onde passei a maior parte do tempo do meu estágio, quando me era dada uma matéria-prima para analisar, uma das primeiras etapas a executar, antes de iniciar a análise, era ir consultar a Ficha de Dados de Segurança, que existe para cada produto existente no laboratório, seja matéria-prima, reagente ou solvente, e ter em atenção os pictogramas e frases de segurança, assim como os EPIs aconselhados a utilizar no manuseamento daquela substância. Nestas fichas constavam, também, entre outras informações, as medidas a adotar quase houvesse algum derrame ou intoxicação.

2.1.1.4) Conhecimentos teóricos e práticos

Com o decorrer do estágio senti que o MICF me preparou bastante bem para as funções que estava a exercer. Tanto a nível teórico, como a nível prático, já tinha contactado antes com a maioria das técnicas que tive de utilizar ao longo do estágio. Por exemplo, na parte da análise de matérias-primas, muitas das análises requeriam medição de pH por potenciometria, leitura de poder rotatório específico, titulações manuais, determinação de humidades, entre muitas outras técnicas com as quais, pelo menos uma vez, já tinha contactado em alguma aula prática; já na parte do produto acabado era comum haver ensaios de dissolução, leitura de pH por potenciometria, titulações manuais, entre outros, muitas vezes, seguindo metodologias com que já tinha contactado antes. Estes conhecimentos derivaram de aulas práticas de algumas unidades curriculares, onde destaco a importância de Química Analítica, Tecnologias Farmacêuticas (I, II e III) e Métodos Instrumentais de Análise (I e II). Estes conhecimentos a que me refiro juntamente com o acompanhamento e explicação dos colaboradores da equipa determinaram o sucesso com que aprendi a manusear os equipamentos e a fazer as análises autonomamente.

2.1.1.5) Desenvolvimento de competências pessoais

O estágio no CQ da Farmalabor permitiu o desenvolvimento das minhas competências pessoais e fez-me crescer enquanto membro integrante de uma equipa de trabalho. Algumas das capacidades que mais desenvolvi foram resiliência, organização e gestão de tempo.

Como é de esperar, nem sempre as análises dão os resultados esperados e, antes de aceitar um resultado fora de especificação como sendo verdadeiro (OOS) e possivelmente originar a rejeição de um produto, é necessário estudar o procedimento da análise e determinar possíveis causas de erro decorrentes de uma má execução da técnica ou de interferências que ocorram. Todo o procedimento inerente a esta investigação é relatado num procedimento interno da Farmalabor, e tem por objetivo, para além da determinação

da causa de erro, a aplicação de ações corretivas e preventivas, por forma a minimizar o seu impacto em situações idênticas que ocorram de futuro (2). Por vezes, e seguindo esse procedimento, era necessário repetir a análise várias vezes até perceber o que se estava a passar, fazendo o despiste se a origem do problema residia na amostra ou num fator externo à mesma. Por esta razão, umas das capacidades que desenvolvi foi a resiliência uma vez que, perante um problema, havia uma necessidade absoluta de o ultrapassar, sem nos confortarmos em aceitar um resultado errado, que, caso não tivesse origem no produto, podia trazer à empresa um prejuízo enorme, se fosse indevidamente rejeitado. A organização e a gestão de tempo foram duas capacidades que desenvolvi em simultâneo uma vez que ao executar análises de diferentes produtos em paralelo era necessário ter capacidade para saber tudo o que estava a acontecer num dado momento e organizar a sequência das diferentes técnicas por forma a rentabilizar o tempo sem comprometer o sucesso da análise. A gestão do tempo advém também porque muitas vezes, surgiam a meio do dia análises que era necessário executar com urgência, por exemplo por estar a ser necessário para o departamento de produção, e por isso era de extrema importância fazer aquela análise no menor tempo possível. Nestes casos também a organização era necessária uma vez que parávamos a análise de alguns produtos a meio para dar prioridade às urgências, tendo de as retomar mais tarde.

2.1.1.6) Procedimentos de utilização de equipamentos

No CQ da Farmalabor, existia, para cada equipamento, um *dossier* onde constavam instruções de trabalho para auxiliar o seu manuseamento. A existência destes *dossiers* foi importante para mim uma vez que neles estavam descritos os procedimentos gerais do uso dos aparelhos utilizados para as análises, assim como os ensaios diários de calibração, e assim eu poderia facilmente guiar-me por eles até os conseguir manusear de forma autónoma, evitando estar constantemente a solicitar ajuda a um colaborador do laboratório.

2.1.2) Weaknesses (Fraquezas)

2.1.2.1) Poucas formações complementares

Um aspeto que me desiludiu no estágio foi o reduzido número de formações complementares que existiram no seu decurso. A única formação a que tive oportunidade de assistir foi a formação sobre as regras de higiene e segurança no laboratório, no primeiro dia de estágio. Aparte essa, não existiram mais formações a que eu pudesse assistir, o que me surpreendeu porque a ideia que tinha era a de que, independentemente da área em que fossemos trabalhar, iria haver periodicamente formações para instrução dos colaboradores

acerca dos mais diversos assuntos. Talvez o período de estágio em que estive na Farmalabor não tivesse refletido o número de formações que ocorrem ao longo do ano, e por azar, estagiei num período em que houve poucas formações deste tipo ou então porque as formações que houve não seriam apropriadas ou não teriam interesse para eu, enquanto estagiária, assistir. Apesar disso, sinto que a forma como fui instruída acerca dos mais diversos assuntos não foi, de todo, insuficiente.

2.1.2.2) Falta de experiência profissional

A falta de experiência profissional na área revelou-se um ponto negativo do meu estágio. Havia análises cuja execução exigia alguma prática e que, mesmo seguindo o procedimento da técnica à risca, por vezes não era fácil executá-las corretamente e em outras, seguir o procedimento ponto a ponto não era estritamente necessário pois quem costumava fazer essa análise, já sabia *à priori* se os tópicos indicados nos procedimentos eram ou não cruciais para o sucesso da análise. Casos desses ocorriam, por exemplo, quando o procedimento indicava uma centrifugação e afinal bastava uma filtração, quando indicava uma dissolução durante x tempo em agitação e/ou aquecimento e afinal metade do tempo era suficiente ou até mesmo quando indicava uma dissolução em agitação que poderia ser substituída por uns minutos em banho de ultrassons. Nestes casos, como eu não tinha essa prática, seguia sempre o procedimento exatamente como estava escrito e, por vezes, no final da análise constatava que tinha perdido algum tempo desnecessariamente.

2.1.2.3) Não ter tido oportunidade de estagiar nas outras áreas do

CQ

Devido ao curto período de tempo do estágio, que irei falar de seguida, não tive oportunidade de estagiar e de conhecer com mais detalhe o controlo que é feito nas outras áreas do CQ. A maior parte do meu estágio foi passada no laboratório de ensaios físicos e químicos, sendo dividido entre análises de MP e análises de PA e apenas tive oportunidade de passar um dia na sala do controlo microbiológico e um dia no CEP, sendo que de manhã acompanhei o controlo de formas líquidas e pastosas e embalagem e de tarde, o controlo de formas sólidas. Obviamente que foi ótimo poder acompanhar estas áreas para ter uma ideia das tarefas nelas exercidas mas gostaria de as ter acompanhado mais tempo, por forma a aprender e a poder participar nas análises que executam. De qualquer forma, tenho consciência que para isso acontecer, não iria conseguir aprender e evoluir da forma que evoluí nas análises de MP e PA.

2.1.2.4) Curta duração do estágio

A meu ver, um dos pontos fracos que encontrei ao fazer uma análise retrospectiva do meu estágio foi o curto período de tempo do mesmo. O estágio decorreu durante 3 meses, numa média de 40 horas semanais, que por vezes não eram atingidas pela existência de feriados e pontes. Assim, sinto que o estágio passou a correr, acabando no momento em que comecei a sentir que estava autónoma e independente. Também devido ao curto período de tempo senti que não tive oportunidade de conhecer devidamente as outras áreas pertencentes ao CQ como a microbiologia, a análise de material de acondicionamento, o CEP da produção de formas líquidas e pastosas e embalagem e o CEP da produção de formas sólidas, o que, no entanto, é perfeitamente compreensível pois o tempo não dá para tudo e tenho noção que para adquirir os conhecimentos e a prática que adquiri no controlo de MP e PA, algo tinha de ficar comprometido. Apesar de ter durado pouco tempo, sinto que este estágio foi uma mais-valia para a minha experiência profissional e não o ter feito teria sido um grande erro.

2.1.3) Oportunities (Oportunidades)

2.1.3.1) Área em grande crescimento

A Indústria Farmacêutica é uma área que oferece aos farmacêuticos um vasto leque de funções possíveis de serem exercidas nos mais diversos departamentos. Para além do departamento do CQ, existe a secção da GQ, da produção, ID e AR, sendo que estas duas últimas não existem na Farmalabor, uma vez que a Farmalabor é apenas uma unidade fabril e os outros departamentos se situam na Medinfar, em Lisboa.

Para além das ofertas de trabalho que existem na IF para um farmacêutico, a própria IF é uma área de grande crescimento e de extrema importância. Cada vez mais a tecnologia e as ciências da saúde estão a evoluir e descobrem-se novas causas de doenças e possíveis hipóteses de tratamento que têm de ser investigadas para o possível desenvolvimento de um novo medicamento, que tem que ter eficácia, qualidade e segurança comprovadas para que possa ser colocado à venda no mercado e à disposição da população; para além disso, também o mercado de medicamentos genéricos está em grande crescimento, sendo cada vez mais os medicamentos genéricos a surgirem.

Posto isto, a IF é uma das áreas com maior potencial de sucesso e que vai ser sempre necessária à população, sendo uma grande oportunidade para nós, estagiários e futuros mestres em Ciências Farmacêuticas, conhecer esta realidade de trabalho.

2.1.3.2) Auditorias

Durante o período do estágio, a Farmalabor recebeu uma inspeção do INFARMED, o que para mim foi uma oportunidade de perceber toda a dinâmica envolvente neste tipo de acontecimento. A inspeção do INFARMED tem uma grande importância para a IF, uma vez que tem como principal objetivo verificar o cumprimento da legislação referente a Boas Práticas de Fabrico e Boas Práticas de Laboratório (3). Acho que ter estagiado numa altura em que a unidade fabril ia receber a inspeção foi um aspeto muito positivo do meu estágio uma vez que consegui perceber que, independentemente da presença dos inspetores dentro do laboratório, a forma de trabalho dos colaboradores não muda, o que significa que todas as normas são cumpridas ao longo de todo o ano e estão presentes em todos os trabalhos efetuados, demonstrando a qualidade e a seriedade da empresa.

2.1.3.3) Perceção da dinâmica das análises

Existe no CQ uma dinâmica muito grande desde que as MP chegam à fábrica, e por isso têm que ser amostradas e analisadas, até à sua incorporação num produto final que tem que ser analisado antes de ser aprovado e libertado para o mercado.

Numa primeira etapa do meu estágio, fui integrada na equipa de análise de MP. As MP, quando chegam ao armazém, são sujeitas a um processo de amostragem e as amostras são enviadas, juntamente com o boletim analítico do fabricante, para o CQ. Uma porção das amostras segue para análise microbiológica, enquanto a outra é armazenada em local próprio para posterior análise físico-química. O analista do CQ, quando chega o BA de uma MP, vai ao referido armário buscar as amostras, vai buscar a especificação dessa MP e consultar a respetiva ficha de segurança e faz o registo de início da análise num *dossier* que existe no laboratório, verificando se a análise a executar é reduzida (onde não se efetuam ensaios considerados periódicos) ou completa (onde se efetuam todos os ensaios descritos na especificação). À medida que decorre a análise o analista deve registar os resultados dos ensaios no BA da MP ou no seu caderno de laboratório. Numa etapa final, o analista entrega o BA e o seu caderno de laboratório à pessoa responsável das MP, que avalia os resultados e aprova ou rejeita o lote da MP em análise. Posto isto, o analista guarda uma porção da amostra na amostrateca e a MP pode ser utilizada para a produção. Periodicamente, as MP que estão armazenadas no armazém da fábrica necessitam de uma reanálise para verificar se continuam em conformidade com as especificações e se podem ser novamente utilizadas. Nestes casos, o registo de início de análise não é necessário e a análise considera-se sempre reduzida (4).

Numa etapa mais tardia do meu estágio, fui integrada no grupo de análise de PA, onde a rotina das análises é ligeiramente diferente das MP. Neste período, tive oportunidade

de analisar misturas para comprimir, produto semiacabado e produto acabado já no acondicionamento final. Ao contrário do que acontece nas análises de MP, que vêm acompanhadas com o respetivo BA, quando um PA chega ao laboratório para ser analisado, este vem acompanhado por um DUL, documento onde vão ser registados todos os ensaios a realizar a esse produto, não havendo registo em cadernos de laboratório. Quando concluída a análise do PA, o próprio analista vai ao sistema informático da Farmalabor e faz a aprovação do lote, emitindo uma folha que é entregue ao responsável do CQ, que vai verificar novamente toda a conformidade do processo. Após a aprovação final do CQ, a libertação do lote é efetuada pela Direção Técnica da unidade fabril. De forma semelhante às MP, uma porção da amostra do PA é guardada na amostrateca (5).

Para mim, ter acompanhado estes dois grupos de trabalho foi uma experiência muito enriquecedora uma vez que pude ter a perceção das diferentes análises que se fazem no controlo de MP e no controlo de PA, assim como a diferença nos processos envolventes à análise de cada um, como por exemplo na aprovação e rejeição de lotes.

2.1.4) Threats (Ameaças)

2.1.4.1) Poucos farmacêuticos a integrar a equipa

Apesar do CQ da Farmalabor ter uma equipa grande e com as competências necessárias às tarefas exercidas neste departamento, os farmacêuticos representam uma minoria da equipa, constituída maioritariamente por químicos e engenheiros químicos. Sendo esta uma secção da IF, para mim, fazia todo o sentido ter mais farmacêuticos a trabalhar nesta área, uma vez que somos os profissionais mais habilitados a lidar com tudo o que diga respeito a medicamentos e outros produtos farmacêuticos. Acho que a formação que temos durante o MICEF prepara-nos bastante bem para exercer estas funções pelo que não compreendo o porquê de existirem tão poucos farmacêuticos neste departamento, constituindo esta uma ameaça ao estatuto de um farmacêutico.

2.1.4.2) Manuseamento de produtos perigosos

Durante as análises eram inúmeros os produtos perigosos que era necessário utilizar. Desde reagentes como ácidos e bases concentradas, reagentes orgânicos e inorgânicos libertadores de vapores nocivos, até às próprias MP que se tinham de analisar, que muitas vezes se tratavam de APIs, que utilizados indevidamente poderiam prejudicar a saúde, todos estes produtos necessitavam de ser manuseados com muito cuidado. Apesar de ter EPIs para minha segurança e deste tipo de produtos serem sempre manuseados dentro de uma

hotte, preocupava-me ter de os manipular e por vezes, ficava com receio de provocar pequenos derrames e contaminar o ambiente envolvente, por não ter destreza suficiente.

3. Conclusão

Num curso superior em que existem tantas áreas profissionais onde podemos ingressar, para iniciar uma carreira é crucial termos competências e experiências que nos diferenciem num mercado de trabalho tão competitivo. Para mim, estagiar numa área da Indústria Farmacêutica foi crucial para a minha formação e uma grande oportunidade para poder conhecer um dos departamentos que mais interesse me suscitava: o Controlo de Qualidade.

O facto de ter sido inserida numa equipa tão acolhedora fez-me adorar este estágio, não só pelo trabalho que exerci, como também pelas pessoas que conheci.

Por fim, sendo este um estágio opcional, sinto que aproveitei ao máximo a oportunidade e não me arrependo minimamente da minha escolha, uma vez que descobri uma área extremamente interessante onde gostaria imenso de, futuramente, exercer funções.

Referências Bibliográficas

(1) Grupo Medinfar – **Farmalabor** (acedido a 14/08/2017). Disponível na Internet:
<http://www.medinfar.pt/farmalabor/>

(2) Farmalabor – Procedimento interno acerca de investigação de resultados OOS.

(3) INFARMED – **Inspeção** (acedido a 16/08/2017). Disponível na Internet:
<http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/inspecao>

(4) Farmalabor – Procedimento interno acerca da amostragem e análise de matérias-primas.

(5) Farmalabor – Procedimento interno acerca da amostragem e análise de produto acabado.

“Polymeric Nanoparticles for Ocular Gene Therapy”

Abbreviations

BRB – Blood-Retinal Barrier

CNV – Choroidal Neovascularizations

DNA – Deoxyribonucleic Acid

eGFP – Enhanced Green Fluorescent Protein

EMA – European Medicines Agency

FDA – Food and Drug Administration

Fig. – Figure

HA – Hyaluronic Acid

HIF-1 α – Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha

ICAM-1 – Intercellular Adhesion Molecule 1

IRBP – Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein

K5 – Plasminogen Kringle 5

miRNA – MicroRNA

mPEG – Monomethoxypoly(Ethylene Glycol)

mRNA – Messenger RNA

NF- κ B – Nuclear Transcription Factor Kappa B

NP – Nanoparticles

PAGA – Poly(Amino Ester)

PAMAM – Poly(Amido Amine)

PCL – Polycaprolactone

PDGF – Platelet-Derived Growth Factor

pDNA – Plasmid DNA

PEG – Polyethylene Glycol

PEI – Polyethylenimine

PGA – Poly-Glycolic Acid

PLA – Poly-Lactic Acid

PLGA – Poly-Lactic-co-Glycolic Acid

PLL – Poly-L-Lysine

PPI – Polypropylenimines

PR – Photoreceptor

RNA – Ribonucleic Acid

RPE – Retinal Pigment Epithelium

siRNA – Small-Interfering RNA

shRNA – Short-Hairpin RNA

S/MAR – Scaffold/Matrix Attachment Region

TGF β -2 – Transforming Growth Factor Beta 2

TNF- α – Tumor Necrosis Factor Alpha

VEGF – Vascular Endothelium Growth Factor

Abstract

With the advancement of medicine and health technologies, gene therapy has shown an enormous potential for the treatment of hereditary and acquired genetic diseases. This type of pathologies is based on mutations in genes that compromises physiological functions and lead to diseases which, currently, have limited successful treatment. Safe and effective formulations that can deliver to the target cells, therapeutic agents capable of modifying gene expression and, thereby, regress the disease are therefore needed. Ophthalmic diseases are a great target for this type of therapy. These therapeutic agents are based in nucleic acids and can be delivered into the cells by viral and non-viral vectors. Although their effective transfection, the firsts have a worrying safety profile that compromise their use, while the seconds can be manipulated to have an improved safety profile, allowing the success of the therapy. Among the most studied non-viral formulations, the polymeric nanoparticles, composed of a large variety of polymers such as PLGA, PEI, Chitosan, PLL and many others have shown to be promising as vectors in gene therapy.

This work offers an update on the advances of polymeric nanoparticles, their structure, their limitations, main features and their potential use for the treatment of genetic diseases that affect the eye, based on genetic mutations, as well as some strategies to increase therapy success, which can be made into the plasmid or directly into the nanoparticles.

Key-words:

Polymeric Nanoparticle, Eye, Gene Therapy, Non-Viral Vector, Ocular Drug Delivery.

Resumo

Com o avanço da medicina e das tecnologias da saúde, a terapia génica tem demonstrado, cada vez mais, o seu potencial no tratamento de doenças genéticas hereditárias e adquiridas. Este tipo de patologias tem por base mutações nos genes que comprometem as mais variadas funções fisiológicas e originam doenças que, atualmente, ainda têm pouca esperança de tratamento por um longo período de tempo com sucesso. Posto isto, surge a necessidade de criar formulações seguras e eficazes, que consigam entregar às células-alvo, agentes terapêuticos capazes de modificar a expressão génica, regredindo a doença. As doenças oftálmicas apresentam-se como um potencial alvo para este tipo de terapia. Estes agentes terapêuticos referidos são baseados em ácidos nucleicos e podem ser entregues às células através de vetores virais e não-virais. Apesar da sua eficácia na transfecção, os primeiros têm um perfil de segurança preocupante, o que compromete o seu uso, enquanto os segundos podem ser manipulados de forma a possuírem um melhor perfil de segurança, permitindo uma terapia de sucesso. Entre as formulações que têm sido mais estudadas, as nanopartículas poliméricas, produzidas a partir de uma grande variedade de polímeros, como PLGA, PEI, Quitosano, PLL, entre muitos outros, têm demonstrado ser bastante promissoras como vetores não-virais usados em terapia génica.

Ao longo deste trabalho vão ser apresentadas algumas destas nanopartículas, a sua estrutura, as suas limitações, principais características e o seu potencial no tratamento de doenças genéticas que afetam o olho, assim como algumas estratégias usadas para aumentar o sucesso da terapia, que podem ser efetuadas no plasmídeo ou diretamente nas nanopartículas.

Palavras-chave:

Nanopartículas Poliméricas, Olho, Terapia génica, Vetores Não-Virais, Entrega Ocular de Fármacos.

I) Introduction

Over the last few decades, medicine has evolved at an enormous rate and researches into the treatment of the symptoms of hereditary diseases classified as incurable has given rise to the search of new treatments that act on the diseases focus: the genetic material. With that arises a branch of molecular medicine, the gene therapy, one of the most promising approaches to medicine of the future.

Gene therapy consists in the intracellular delivery of genetic material (DNA or RNA) with subsequent modification of gene expression and its main target is the acquired genetic diseases (Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015). There are four different approaches of gene therapy:

1. Gene replacement – introduction, in patient chromosome, of a normal copy of the interest gene, with the removal of the defective copy of the gene, allowing the expression of the desired protein. This strategy is inefficient and not feasible;

2. Gene repair – in the cell with the defective gene, the mutated sequence is repaired by the endogenous repair mechanisms or by enzymes delivered with an exogenous DNA template that allows the shift with the wrong sequence. This approach isn't successful because, in mammals, the homologous recombination is inefficient, the integration is random and has mutagenicity;

3. Gene Addition – consists in the introduction of a new gene (and therefore a new protein) or a resident gene in the genome, allowing to strengthen a function that already exists;

4. Gene Silencing – in this approach there are three different intermediaries that can lead to the blockade of gene expression by acting on mRNA: miRNA, siRNA and shRNA. This sequences of genetic material blocks the gene expression by a defined and complex mechanism that prevents the formation of the disease-causing protein.

The success of this therapy depends not only on the design of the genetic material but also on the efficiency and safety of the delivery vehicle. There are two types of vehicles that are used in gene therapy: viral vectors and non-viral vectors. The firsts, viral vectors, that includes different types of virus such as adenovirus, lentivirus and many others, are currently the most commonly used delivery systems in gene therapy. They are extremely efficient in the transport of genetic information into the nucleus of the cell but have a low packaging capacity and a worrying safety profile given their immunogenicity, carcinogenicity and the potential for genomic insertional mutagenesis (Mitra, Zheng et al., 2016). In the other hand, non-viral vectors are an excellent alternative to the problems of viral vectors

and have the advantages of a safety profile to the genome, non-immunogenicity, easy and low production costs and large payload capacity (Adijanto and Naash 2015). However, they have a low transfection rate, weak transgene expression and rapid downregulation that can compromise the success of this therapy (Zulliger, Conley et al., 2015; Mitra, Zheng et al., 2016). In order to overcome these obstacles, non-viral systems have been increasingly studied and nanoparticles (NPs), in particular polymeric NPs, are proving to be promising as a great gene delivery vector.

For gene therapy, the eye is an excellent target-organ once it has a well-defined anatomy, is easily accessible, shielded from systemic circulation, constitutes an immune privileged position where immunogenic response can be mostly avoided due to the presence of blood-retinal barrier, a small size that allows the use of small amounts of therapeutic agents and, in recent years, a lot of dystrophies and pathologies that affect the eye have been related to genetic alterations (Hennig and Goepferich 2015; Martens, Remaut et al., 2015; Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015; Oliveira, Rosa da Costa et al., 2017).

Along this work, different polymeric NPs that have been studied for gene therapy for the treatment of ophthalmic diseases, will be discussed, describing their main characteristics and in which cases they have been used.

2) Ophthalmic administration

2.1) The human eye – anatomy and physiology

The eye is a sense organ of the human body that allows vision and is responsible for capturing most of the information coming from the outside of the body.

Anatomically, the eye is composed of three layers: the outermost layer, called fibrous tunic, composed of sclera and, in the anterior part, the cornea; the middle layer, called choroid tunic, made up of the ciliary body and the iris; and finally, the inner layer, also called nervous tunic, composed of the retina.

Apart from this, the eye has many other components, which, the most important of them, are briefly described in the table I and schematically represented in fig. 1.

Table I – The most important eye components and their respective characterization (Seeley, Stephens et al., 2003).

Component	Characterization
Sclera	It's the white part of the eye and sustain the shape of the eye.
Cornea	Avascular and transparent structure that allows the light to enter the eye.
Choroid	A thin membrane with blood vessels that nourishes the outer part of the retina. Is located between sclera and retina.
Iris	Contractile structure responsible for eye colours. Surrounds an opening called pupil.
Pupil	Pupil is a component of the eye that reacts to the light: enlarges in dim light and constricts in bright light.
Ciliary Body	Muscle that control the accommodation of lens by suspensory ligaments.
Retina	A thin layer composed of two types of photoreceptors: rods and cones. The visual information is detected by this cells and translated to the brain by nerves.
Conjunctiva	A thin and transparent tissue covering the sclera that protect the eye against allergens and infective agents.
Lens	A biconvex and transparent structure located between the pupil and vitreous.
Aqueous humour	A fluid that helps in the maintenance of intraocular pressure between cornea and lens.
Vitreous humour	Transparent gelatinous substance that fills the posterior chamber of the eye. Helps in the maintenance of intraocular pressure and holds the lens and retina.
Macula	Central part of retina where cones are more concentrated.
Fovea	Located in the center part of the macula, the fovea is the point where light is focused.
Optic Nerve	Captures the information through the cones and rods and sends it to the brain, where signals are interpreted and visual perception is possible.

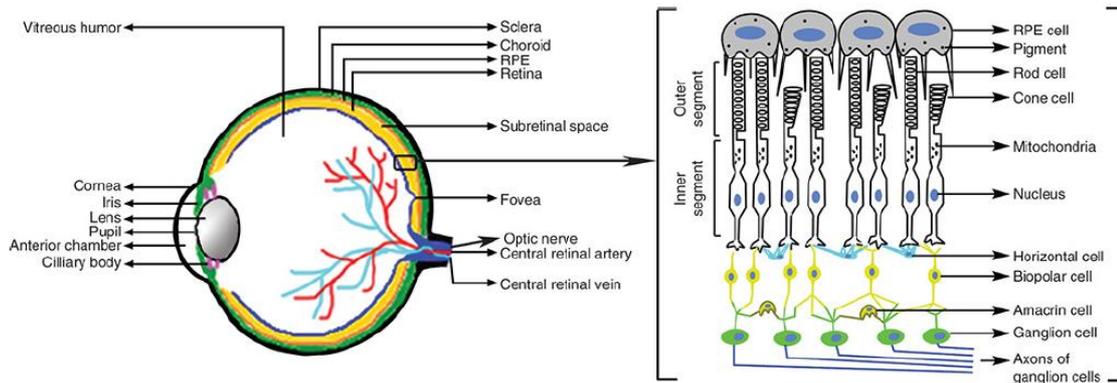


Fig. 1 – Schematic representation of the eye (left) and the retina (right). Adapted from: (Mitra, Zheng et al., 2016).

Clinically, ophthalmologic diseases are classified according to the structure involved: the diseases that affects the anterior segment and diseases that affects the posterior segment of the eye. The anterior segment is made up of the cornea, iris and lens while the posterior segment is made up of vitreous, retina, choroid and sclera. Later I will present the most studied diseases for ocular gene therapy.

2.2) Ocular administration routes

One of the most important factors to the success of non-viral gene therapy is the administration route of the genetic material, which should allow a high transfection rate, in the right target cell, without risk to the patient and the lowest possible adverse effects (Zulliger, Conley et al., 2015). Given the anatomy of the eye, there are several administration routes possible for this therapy, each of them with advantages and disadvantages (Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015).

In the next topics are presented some of the most used ocular administration routes for ocular gene therapy.

2.2.1) Topical administration

Topical administration is the most used administration route for the treatment of eye disorders in conventional therapies, particularly in the anterior segment diseases given its non-invasive property (Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015). However, this route of administration is not efficient enough to be used in gene therapy because of the barriers that have to be crossed until the target-cells (Zulliger, Conley et al., 2015) which leads to a low penetration (Zulliger, Conley et al., 2015) and so, low bioavailability of the drug, especially in the case of large molecules such of nucleic acids (Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015).

Surface instillation can be used to target cornea but the clearance mechanisms of this structure, that includes lacrimation and tear turn-over, lead to a limited bioavailability (Oliveira, Rosa da Costa et al., 2017).

2.2.2) Periocular injection

This administration route includes peribulbar, retrobulbar, posterior juxtасcleral, sub-tenon and, the most studied, subconjunctival injections (Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015). In spite of being a rather invasive method, the injection of particles into the subconjunctival space, particularly the injection of nucleic acids such RNA through non-viral vectors, has shown to be very promising to targeting cornea and small particles seem to be able to successfully penetrate the tissue (Zulliger, Conley et al., 2015). Subconjunctival injections allows the administration of large volumes and can be repeated if necessary without significant adverse effects due to the procedure but can lead to complications related with possible systemic absorption (Oliveira, Rosa da Costa et al., 2017). In gene therapy, as the nucleic acids are generally molecules with large molecular weight, they are retained at the injection site, having a sustained delivery with less possibility of systemic absorption (Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015), minimizing the disadvantage mentioned above.

Periocular injections have corneal epithelium, photoreceptors (PR) and retinal pigment epithelium (RPE) as target cells and its considered non-invasive, however, have low transfections rates for retina and retinal pigment epithelium cells (Zulliger, Conley et al., 2015).

2.2.3) Intravitreal injection

Vitreous humour is a substance with jelly-like texture, due to its composition rich in proteins, collagen fibers, hyaluronic acid (HA) and other proteoglycans (Zulliger, Conley et al., 2015). Because of this complex structure, the administration of NPs into the vitreous has some peculiarities, one of them the fact that charged particles can easily interact with proteins and steric hindrance can occur. Taking this into account, the charge of NPs is crucial for the success of this route of administration and studies revealed that cationic serum albumin particles cannot penetrate vitreous while anionic particles of the same compound can penetrate well. Another factor that influences the diffusion rate is the particle size since the average pore size of the vitreal mesh is about 550nm and so, NPs with a diameter larger than 500nm have low diffusion rates. Researchers have already observed

successful diffusions of particles with size ranging between 350nm and 600nm through the whole retina and subsequent transfection of PR and RPE cells (Zulliger, Conley et al., 2015).

Intravitreal injections can be used to delivery NPs for gene therapy in inner retina, the target cells of this injections, as already studied in liposomes and PLGA particles (Zulliger, Conley et al., 2015).

This administration route has the advantages of being considered as non-invasive, relatively easy, having few adverse effects associated and the administration of high doses is possible, despite the risk of ocular infections, damage to the retina (Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015; Zulliger, Conley et al., 2015; Oliveira, Rosa da Costa et al., 2017) and increase of intraocular pressure (Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015).

2.2.4) Subretinal injection

In gene therapy, the injection of NPs in the subretinal space allows the contact of nucleic acids with PR, outer retinal cells and RPE cells (Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015; Oliveira, Rosa da Costa et al., 2017).

With this route of administration it is possible to achieve high transfection rates (Zulliger, Conley et al., 2015) being useful for treatment of retinal degenerations caused by gene mutations but is an invasive method (Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015). Subretinal injections are associated with risk of ocular damage as RPE lesions, haemorrhages, retinal tears, sub- and pre-retinal fibrosis and retinal detachment, which can lead to cell death and loss of visual function (Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015; Zulliger, Conley et al., 2015; Oliveira, Rosa da Costa et al., 2017), that is explained because the introduction of therapeutic liquid induces separation of PR from RPE, compromising the structural integrity and cellular nutrition of PR (Zulliger, Conley et al., 2015). In addition to lesions, subretinal injections can also lead to an inflammatory response with recruitment of cells from the immune system to the subretinal space (Zulliger, Conley et al., 2015).

Despite all the drawbacks associated with this method, the subretinal injection is one of the most used route of application for the treatment of inherited retinal disease because of its effectiveness (Zulliger, Conley et al., 2015).

2.2.5) Suprachoroidal injection

Suprachoroidal injections allows the administration of NPs below the sclera and above choroid (Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015; Zulliger, Conley et al., 2015). Suprachoroidal administration of NPs has as target the posterior segment cells of the eye (Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015), particularly, PR and RPE cells, without retinal

detachment (Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015; Zulliger, Conley et al., 2015). Despite its safety profile, this route of administration has, however, inefficient transcleral transport (Zulliger, Conley et al., 2015), from large particles (200nm), which do not diffuse at all, to small particles (20nm in diameter), which diffuse with a very low rate (Zulliger, Conley et al., 2015). To improve the rate of diffusion and the transfection of plasmids to cells, electroporation techniques are used (Zulliger, Conley et al., 2015) as has been showed in a study conducted by Touchard where a non-viral plasmid was delivered in a suprachoroidal space, and was efficiently transduced in choroidal cells, RPE cells and in the outer segments of PR (Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015).

Another disadvantage associated with this administration is that macromolecules are cleared rapidly and it's necessary a sustained release for longer action duration of the formulation (Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015).

2.2.6) Intracameral injection

Intracameral injection consists in the injection of nucleic acids into the anterior chamber of the eye and it has been studied in viral gene therapy but has not been very effective because of the rapid turnover of aqueous humour, which decreases the contact time of the particles with the eye tissues and so, maintenance of vector concentration is difficult (Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015; Oliveira, Rosa da Costa et al., 2017).

2.2.7) Intravenous injection

To circumvent the risk of eye damage, the delivery of therapeutic compounds to the bloodstream it's a useful option for the treatment of pathologies that affects inner retina and RPE, however, there is a large barrier that particles have to cross to reach retinal cells: the blood-retinal barrier (BRB) (Zulliger, Conley et al., 2015). BRB it's a structure that prevents the diffusion of large compounds to retina and to overcome this barrier, NPs have to be targeted with an antibody against the transferrin receptor, present in retinal vascular cells (Zulliger, Conley et al., 2015).

Taking into account its characteristics, the major advantage of this route is due to the fact that there are no adverse effects due to direct injection into the eye but there is a risk of opsonisation and phagocytosis of NPs, that leads to less bioavailability, and off-target effects on other tissues (Zulliger, Conley et al., 2015). Although the NPs are not administrated directly in the eye, this route of administration can be very successful, specially using vectors that target NPs to the right cells, to prevent ectopic expression (Zulliger, Conley et al., 2015).

Actually, from a practical point of view, just intravitreal and intravenous administrations are feasible in ocular human gene therapy because the other routes of administration are too invasive or not effective enough (Zulliger, Conley et al., 2015) and further researches are needed.

2.3) Barriers to the ophthalmic administration

The NPs with genetic material have a long way to course and biological barriers to overcome until the target ocular structures, depending on the chosen route of administration and its distance to the cells of interest. Even when administered near the site

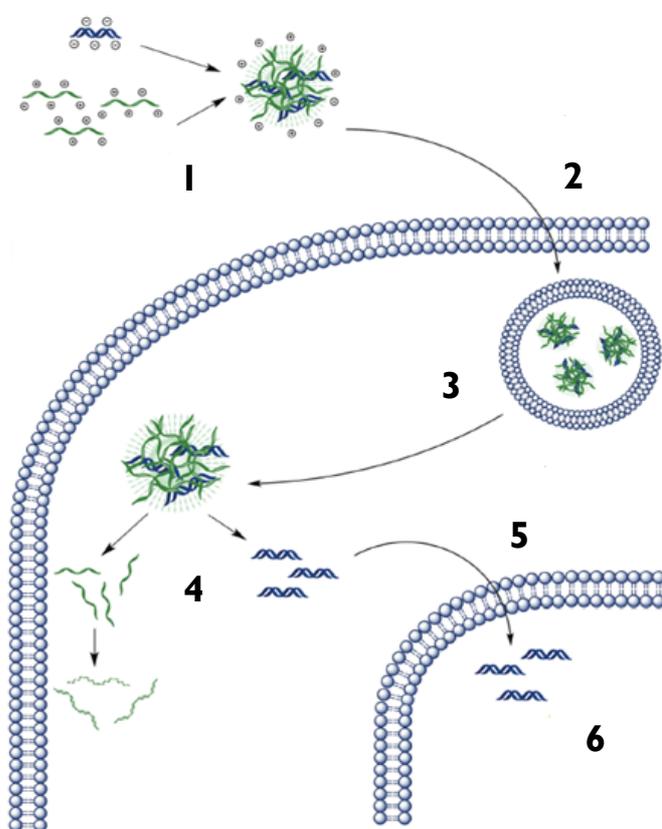


Fig. 2 – Intracellular nucleic acid delivery steps. 1) Vector and nucleic acid association in polyplex 2) Cellular uptake 3) Endosomal escape 4) Cargo unpacking and vector degradation 5) Intracellular trafficking and nuclear uptake 6) Modification of gene expression. Adapted from: (Bishop, Kozielski et al., 2015).

of action, NPs have to cross histological layers specific of different structures of the eye until they reached the cell membrane.

Cell membrane is one of the most important barriers for effective gene therapy (Zulliger, Conley et al., 2015) and to cross it there are two principal mechanisms, depending of the target-cell and the physical properties of NPs: phagocytosis or endocytosis (Adijanto and Naash 2015). For example, the RPE cells have the two types of machinery and preferentially use phagocytosis that makes the transfection of these cells easier, once the membrane receptors are in constant renewal and phagocytic mechanism is involved in this process (Zulliger, Conley et al., 2015), whereas PR depends on endocytosis mediate by clathrin or caveolae (Adijanto and

Naash 2015; Zulliger, Conley et al., 2015). One problem associated with endocytosis is the fact that endosomes mature and fuse with lysosomes and NPs subjected to this type of

internalization are easily degraded by acid hydrolases of lysosomes (Adijanto and Naash 2015), compromising the success of therapy (Zulliger, Conley et al., 2015). NPs that eventually escape from endolysosomes will release genetic material in cell cytosol and, in the case of DNA, the nucleic acid must reach the nucleus, where modifies the gene activity (Adijanto and Naash 2015). Over the years, strategies have been studied to increase specificity and cellular uptake of NPs by modifying their surface to target receptors on the outside of cell membrane (Zulliger, Conley et al., 2015). These strategies includes coating drug carriers with specific antibodies for cell receptors, small receptor ligands or cell-penetrating peptides (Adijanto and Naash 2015; Zulliger, Conley et al., 2015).

After entering the cell, the nuclear membrane is the second cellular barrier that transgenic DNA have to cross to be transcribed effectively (Zulliger, Conley et al., 2015). In proliferating cells, this process is straightforward because nuclear envelope breaks and delivered DNA can enter (Adijanto and Naash 2015; Zulliger, Conley et al., 2015). The problem is that cells of the eye, like PR or RPE cells are post-mitotic and because of that, this is a rate-limiting step and effectiveness of gene therapy can be decreased (Adijanto and Naash 2015). Therefore, how do molecules reach the nucleus? For this question there are several possible answers: small molecules can diffuse by nuclear pores that has 9nm in diameter; larger molecules can enter the nucleus by active transport, provided with a nuclear localization signal (inclusion of this signals on particle envelope can be used to directly target the vector to the nucleus, an approach tested in the eye with success); or associating with NPs or DNA, proteins that have tendency to be translocated to the nucleus (Zulliger, Conley et al., 2015). When the delivered genetic material is an RNA, the nuclear entry is not necessary, since its function is exerted on the cytosol, and taking this into account, some studies have already shown successful transgene expression with compacted RNA NPs, however with a short time periods of expression because of the instable nature of RNA (Zulliger, Conley et al., 2015).

Finally, once in the nucleus, DNA can then exert its function and modify the gene expression. Fig. 3 show this whole path, from the formation of polyplex to the release of nucleic acid into the nucleus of the cell.

3) Plasmid design for enhanced transgene expression

In the previous topic were presented some strategies to enhance cellular uptake of NPs and nuclear entry of transgenic DNA. Here, I am going to present some strategies related with vector engineering, useful to achieve a successful transgene expression.

The ideal plasmid for non-viral delivery has to be maintained as an episome, preventing genomic integration, promote cell-specific expression, and a production of high levels of protein expression stable in a long-term period without gene silencing (Adijanto and Naash 2015).

First, to target a specific cell-type, some specific promoters can be used. For example, to target PR, rhodopsin and rhodopsin kinase promoters, which only target cones, can be incorporated into plasmid whereas cone and rod homeobox and IRBP can be used to target PR in general (Adijanto and Naash 2015; Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015). Although their usefulness, the effectiveness of this type of promoter could be compromised in a disease situation, once the cells are not 100% functional. Because of that, the need of other types of promoters arises, as constitutive promoters that have the advantage of not being affected by the condition of cells. One of the most used is CMV promoter, which has the ability to induce robust protein expression in a wide type of cells. This promoter, however, is rapidly silenced and inactivated by methylation of CpG motifs (clusters of C and G nucleotide pairs), not being able to achieve long-term expression (Adijanto and Naash 2015; Zulliger, Conley et al., 2015). To circumvent this problem and avoid methylation of the sequence,

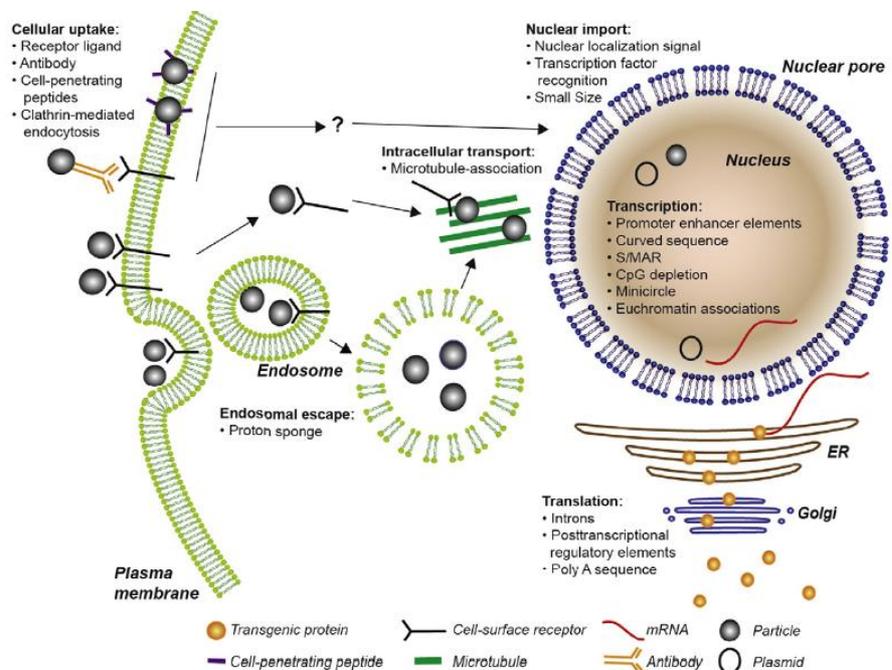


Fig. 3 – Diagram illustrating modifications to the particle or vector used to improve transfection efficiency or expression. Adapted from: (Zulliger, Conley et al., 2015).

minicircles of DNA, less susceptible to inactivation, or vectors depleted of CpG motifs, could be used (Zulliger, Conley et al., 2015).

Not only methylation could compromise the transgene expression. The structure of chromatin of plasmid is crucial for transcription initiation and studies revealed that the curvature in DNA helix it's extremely important to the access of specific binding sites by proteins of transcription complex, being left-handedly curved DNA more effectively transcribed than right-handedly curved DNA (Zulliger, Conley et al., 2015).

One of the most documented strategies to improve long-term transgene expression is the inclusion of an S/MAR sequence in plasmid. The S/MAR sequence allows an interaction with nuclear matrix proteins that anchors and maintains the plasmid inside the nucleus in an episomal position during mitosis (Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015; Zulliger, Conley et al., 2015). This sequence doesn't show integration in genome and can stay inside dividing cells for more than 100 generations and also can promote increased transgene expression in post-mitotic cells once the sequence contain a AT-rich regions that relieve the superhelical strain of plasmid, making the transcription easier (Adijanto and Naash 2015; Zulliger, Conley et al., 2015). This hypothesis has already been successfully used in RPE cells, where longevity of transgene expression was significantly improved (Koirala, Makkia et al., 2013; Adijanto and Naash 2015; Zulliger, Conley et al., 2015).

Finally, the presence of introns in mRNA, possible by the large payload of non-viral vectors, seems to stabilize the molecule, promoting protein translation by a mechanism not totally clarified, but that has shown positive results. A variation in polyadenylation sequence in mRNA, essential for the translation process, also seems to influence protein levels, although the alternate polyA signals have not yet been studied on plasmids for ocular gene therapy (Zulliger, Conley et al., 2015). In Fig. 3 we can see these strategies illustrated in a diagram, as well as the strategies to enhance cellular and nuclear uptake.

4) Polymeric Nanoparticles

The ideal ocular drug delivery system should be non-irritating, biocompatible and biodegradable, prolong the release of the drug, target desirable eye segment without ectopic uptake and expression, has to have reduced side effects and to treat chronic diseases, they should provide a persistent therapeutic throughout the life of the patient (Conley and Naash 2010; Kalomiraki, Thermos et al., 2016; Oliveira, Rosa da Costa et al., 2017). Despite the

difficulty in finding the ideal vector, polymeric NPs can satisfy most of these criteria, being a promising candidate to ocular delivery system in gene therapy.

Non-viral NPs don't have a consensual classification and some authors divide them into lipoplexes, a lipid-based delivery systems where lipids are incorporated into nanoparticles and complexes drugs and polyplexes, NPs based on polymeric molecules that complexes

a therapeutic agent (Zulliger, Conley et al., 2015). In polyplexes we can found a variety of NPs, classified in accordance to the polymer that are made and, for gene therapy, nucleic acids can be adsorbed into the surface of this nanoparticles, be encapsulated in their inner or be linked to polymers by electrostatic interactions (Adijanto and Naash 2015; Oliveira, Rosa da Costa et al., 2017), as we can see in Fig. 4. The most used polymers in ocular gene therapy are described in the next topics as well as the most successful formulations that have been studied about them in ocular gene therapy.

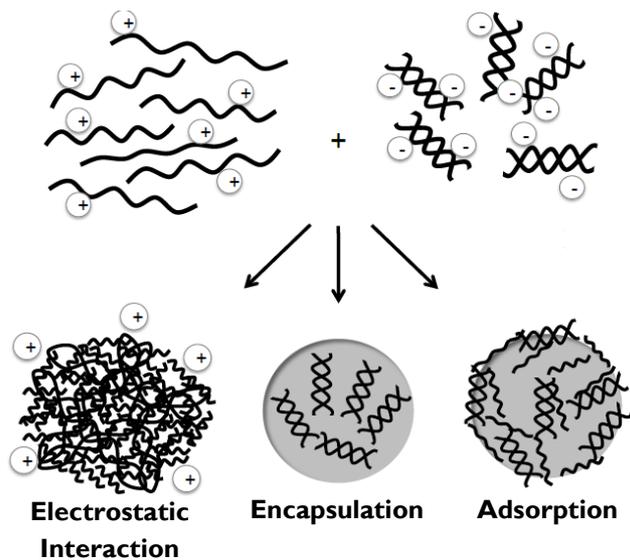


Fig. 4 – Packaging strategies. Adapted from: (Oliveira, Rosa da Costa et al., 2017).

4.1) PLGA and PLA nanoparticles

NPs of polyesters, including poly-glycolic acid (PGA), poly-lactic acid (PLA) and their copolymer poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) are widely used for the delivery of nucleic acids due to their properties (Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015). They have the ability to bind plasmids and simultaneous deliver drugs and DNA, are nontoxic, biodegradable and biocompatible, have capacity to be rapidly internalized, are FDA- and EMA- approved polymers and a good option to be used in hybrid NPs (Adijanto and Naash 2015; Hennig and Goepferich 2015; Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015; Alhalafi 2017).

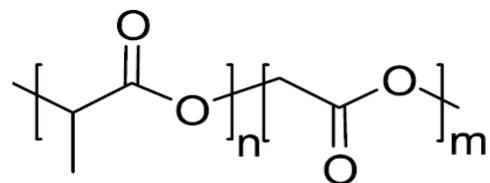


Fig. 5 – Chemical Structure of PLGA. Adapted from: (Oliveira, Rosa da Costa et al., 2017).

For PLGA (Fig. 5) NPs, the rate release of cargo can be controlled by changing the ratio of lactic acid to glycolic acid monomer, where, increasing lactic acid content decrease the degradation rate of particles (Tamboli, Mishra et al., 2011; Adijanto and Naash 2015). In PLGA NPs, lactic acid and glycolic acid are linked by ester bounds and are neutral at physiological pH, which allows that, when internalized by endocytosis, the acid environment of the endosomes provides an acid-catalysed hydrolysis of the ester bounds and positively-charged intermediates are formed and destabilize the endosomes, allowing the escape of NPs (Adijanto and Naash 2015). Because of this lack of cationic charges, PLGA do not effectively encapsulate DNA, that are negatively charged, and, to overcome this disadvantage, this polymer can be incorporated into particles with other polymers, such as chitosan or PEI, giving origin to a hybrid particle with improved properties, such as plasmid DNA encapsulation efficiency (Adijanto and Naash 2015).

The most of the studies of ocular gene therapy that test this type of nanoparticles focus on PLGA NPs and on hybrid NPs, as we will see below and, the most of them, focuses the research on diseases that leads to excessive formation of new blood vessels within the structures of the eye.

4.1.1) PLGA nanoparticles

When the cells of the eye are in an hypoxic situation, a series of mechanisms are activated to compensate this state: there are expression of HIF-1 α , which initiates a complex signalling cascade that results in upregulation of pro-angiogenic factors, as VEGF and subsequently an abnormal formation of new blood vessels – neovascularizations (Hennig and Goepferich 2015). Neovascularizations lead to fluid accumulation, an inflammatory response and haemorrhages in retina with risk of retinal detachment and PR degeneration (Hennig and Goepferich 2015). Proliferative diseases of blood vessels in posterior segment of the eye, such as age-related macular degeneration and diabetic retinopathy, are responsible for many cases of progressive vision loss (Hennig and Goepferich 2015). Taking into account the mechanism behind the loss of vision, directing therapies for the suppression of VEGF, as anti-VEGF molecules, is a huge opportunity for the treatment of this diseases (Hennig and Goepferich 2015).

In an *in vivo* study in rats conducted by Singh, an anti-VEGF intraceptor plasmid has been delivered to the eye by intravenous administration of surface-functionalized PLGA NPs. The anti-VEGF intraceptor consists in a recombinant construct of VEGF-binding domains 2 and 3 of VEGFR-1/Flt-1 receptor coupled with endoplasmic reticulum retention signalling sequence, a peptide that prevents secretion of endogenous proteins, as VEGF. By this way,

anti-VEGF intraceptor binds VEGF intracellularly and sequesters it into endoplasmic reticulum, preventing its release from the cell. To facilitate endocytosis of NPs two molecules that act as promoters were used: a linear arginine-glycine-aspartic acid peptide, which binds integrin receptor, and transferrin, that has a membrane receptor. Although by a mechanism not totally clarified, in ocular neovascularization, both integrins and transferrin receptors have been shown to be upregulated, justifying the increased delivery of plasmid into the eye. NPs dual-functionalized have been detected in PR and in RPE cells and reduced retinal and choroid-RPE cells VEGF levels and, consequently, reduced CNV areas (Singh, Grossniklaus et al., 2009; Conley and Naash 2010; Adijanto and Naash 2015; Oliveira, Rosa da Costa et al., 2017).

Qazi conducted a study where a plasmid containing a shRNA expression cassette against VEGF-A was delivered by corneal intrastromal injections in PLGA NPs to regress neovascularization in a murine model with a sustainable release. The main objective of this study was not to prove the efficacy of genetic material in regressing neovascularization but to prove that the delivery of the cargo via PLGA NPs is slower than with naked plasmid which has a short-term delivery. The results of the study shown that both naked and PLGA-encapsulated plasmids causes a decrease in the levels of VEGF-A mRNA in neovascularized corneas but the NPs induced a greater reduction in protein expression. The phenotypic regression of CNV seen in treated animals was sustained, in animals treated with PLGA NPs compared to animals treated with naked plasmid, a fact that confirms the primary purpose of this study. Thereby, was proved that PLGA NPs are a high-payload system with an initial release of cargo located near the surface of particles and a sustained release of the remaining load, achieving prolonged effects in therapy (Qazi, Stagg et al., 2012; Chaplot and Rupenthal 2014; Chaurasia, Lim et al., 2015).

Although the great potential of directly anti-VEGF therapies, there has been some evidence that suppressed expression of this factor alone is not the sufficient to inhibit CNV in the most severe cases. HIF-1 α regulates the transcription of many proangiogenic factors, as VEGF, erythropoietin, inducible nitric oxide synthase, PDGF and others and so, knocking-down HIF-1 α gene results in a down regulation of these factors. The inhibition of HIF-1 α by pshHIF-1 α , a shRNA-expressing plasmid DNA delivered in PLGA NPs was studied by Zhang in an *in vivo* CNV rat model, injected by intravitreal route to RPE cells. This study showed that PLGA NPs successfully delivered the construct to RPE cells and protect them from enzymatic degradation, and showed that shRNA against HIF-1 α significantly reduced the extent of neovascularization in the murine model, with no deleterious effects to the retina functions, being a promising candidate for the treatment of CNV in humans (Zhang, Wang et

al., 2010; Tamboli, Mishra et al., 2011; Adijanto and Naash 2015; Mitra, Zheng et al., 2016; Oliveira, Rosa da Costa et al., 2017).

Another approach to control neovascularizations it's to promote the production of natural anti-angiogenic factors, as K5, an 80-amino-acid proteolytic fragment of plasminogen that inhibit VEGF expression through the HIF-1 α pathway, modulates the expression of inflammatory factors induced by hypoxia and, posteriorly, can lead to apoptosis of endothelial and tumour cells. An expression plasmid of K5 was encapsulated in PLGA:chitosan NPs by Park and its team and the efficacy of these NPs on improving ischemia-induced retinal vascular leakage and retinal neovascularizations, the direct causes of diabetic macular edema and vision loss in diabetic patients, were evaluated. This study reports for the first time, the combination of anti-angiogenic factors with nanotechnologies in the treatment of diabetic retinopathy and showed that intravitreal injection of K5-NPs allows a high and sustained expression of K5 in retina, blocks ischemia-induced retinal neovascularization and reduce retinal vascular leakage without detectable cytotoxicity (Park, Chen et al., 2009; Hennig and Goepferich 2015). A similar study was conducted by Jin where PLGA:Chitosan NPs containing a K5 expression plasmid were injected by intravitreal administration in CNV rat models to target retina and sub retinal space. The results of this study showed that K5 nanoparticles downregulated the VEGF expression, as expected, and showed that the expression of TNF- α and ICAM-1, inflammatory factors that play an important role in leukocyte adhesion and infiltration, was suppressed, indicating an anti-inflammatory effect of the peptide (Jin, Zhou et al., 2011; Adijanto and Naash 2015; Oliveira, Rosa da Costa et al., 2017).

Proliferative vitreoretinopathy is a pathology of the eye characterized by an abnormal re-enter of RPE cells in cell cycle, with proliferation, migration of cells and secretion of extracellular matrix proteins by them. One of the factors that is involved in the physiopathology of this disease is PDGF-BB, which seems to enhance the effects of proliferation and migration of RPE cells. Taking this into account, strategies that targeting PDGF-BB gene and block the expression of the factor have potential to prevent the development or recurrence of vitreoretinopathy. This approach was studied *in vitro* by Du using novel biodegradable mPEG-PLGA-PLL NPs encapsulating a siRNA that target and continuously suppress the production of PDGF-BB from rat RPE cells. The association of these compounds in a single particle is due to the ability of PLL to enhance encapsulation efficiency because tightly bounds siRNA in the inner water phase and the presence of PEG enhance biocompatibility of NPs. The results of this study shown a significant decreased

PDGF-BB mRNA, in transfected cells, and a tendency to inhibit cell proliferation and viability was observed (Du, Shi et al., 2011).

4.2) Polyethylenimine nanoparticles

Polyethylenimine (Fig. 6) it's a synthetic cationic biodegradable polymer with high charge density that has been investigated as a carrier to delivery genetic material incorporating NPs in ocular gene therapy (Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015), is one of the most efficient transfection agents (Zulliger, Conley et al., 2015) and the most used in gene therapy (Oliveira, Rosa da Costa et al., 2017). PEI has

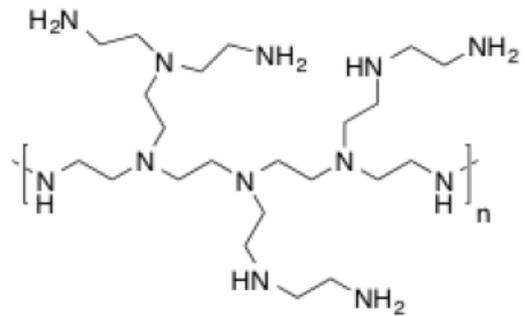


Fig. 6 – Chemical structure of PEI. Adapted from: (Bishop, Kozielski et al., 2015).

the capacity to, spontaneously, bind nucleic acids allowing a high transfection rate when used for gene delivery and an excellent buffering capacity that enhances endosomal escape inside cell by a mechanism which will be explained later, however, toxicity *in vivo* seems to be its major problem, which could be attenuated by the addition of PEG to the PEI NPs (Tamboli, Mishra et al., 2011; Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015; Zulliger, Conley et al., 2015).

Also PEI NPs have been studied to delivery therapeutic agents in proliferative vitreoretinopathy. One of them was studied by Gomes dos Santos where antisense oligonucleotides that target TGFβ-2, a growth factor associated with glial proliferation present in disease's pathology, were tested *in vitro* in rat retinal Müller glial cells and *in vivo* in rats injected by intravitreal route. Oligonucleotide-PEI complex has shown to be efficient in transfecting retinal Müller glial cells in normal rat eyes with a down-regulation of TGFβ-2 mRNA and an inhibition of TGFβ-2 protein expression without detectable toxicity. These results showed an inhibition of cell growth with PEI nanoparticles that was not observed with the injection of naked oligonucleotide, reinforcing the importance of the vector in this kind of therapy (Gomes dos Santos, Bochot et al., 2006; Tamboli, Mishra et al., 2011; Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015; Zulliger, Conley et al., 2015; Mitra, Zheng et al., 2016).

Kurosaki test ocular gene delivery using ternary complexes with PEI NPs coated of anionic polymers as γ-PGA and chondroitin sulphate. The main purpose of this study was not only to prove the capacity of NPs to transfect the plasmid but also to prove that coating PEI NPs with anionic polymers can attenuate the toxicity associated with cationic NPs. *In*

in vitro experiments in human RPE cell line showed that pDNA/PEI complexes have high transfection rates and high cytotoxicity, evidenced by turbidity caused by aggregated NPs with vitreous and, on the other hand, showed that ternary complexes achieve high transfection efficiency with a safety profile and biocompatibility, once turbidity was not observed. *In vivo* experiments in rabbits injected by intravitreal route showed highest transfection rates in retina to coated PEI NPs than PEI NPs, a result that may be due to the fact that uncoated NPs aggregate and were immobilized in vitreous, being consistent *with in vitro* studies (Kurosaki, Uematsu et al., 2013). Although this study did not test any genetic molecule to the treatment of a specific disease, it was very useful because demonstrated a way to circumvent the cytotoxicity caused by the use of this polymer in NPs.

4.3) Chitosan nanoparticles

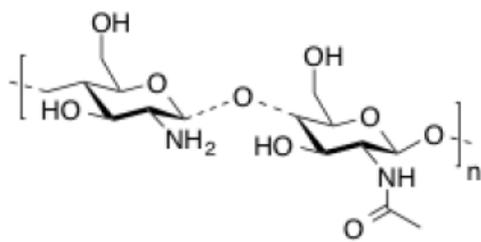


Fig. 7 – Chemical structure of chitosan. Adapted from: (Bishop, Kozielski et al. 2015).

Chitosan (Fig. 7) is a natural biodegradable cationic composed of D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine units linked by a β (1,4) glycoside bond that are able to successfully bind DNA and siRNAs and is an attractive carrier to target cornea because of its mucoadhesiveness, due to the capacity to bind the negative charges of mucus with relative low cytotoxicity (Tamboli, Mishra et al., 2011; Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015; Oliveira, Rosa da Costa et al., 2017). Compared to others polymeric NPs, chitosan NPs present lower transfection levels because it has a poor solubility at physiological pH and inefficient endosomal escape (Tamboli, Mishra et al., 2011; Adijanto and Naash 2015) due to its low buffering capacity and transfection efficiency depends of the molecular weight of chitosan where high-molecular weight chitosans have a higher density of positive charges and form more compacted DNA-NPs with a slower release of the cargo from NPs matrix (Tamboli, Mishra et al., 2011). One approach to overcome the solubility limitation of chitosan is a combination studied by Mitra where ethylene glycol branches were conjugated to the polymer, showing enhanced water solubility at a neutral pH, leading to hydrophilic, biodegradable and low immunogenic NPs that are able to successfully deliver genes to RPE cells without signs of retinal toxicity or degeneration when compared to unmodified chitosan NPs after subretinal injections in mice (Mitra, Han et al., 2014; Mitra, Zheng et al., 2016).

NPs made of HA and chitosan, two bioadhesive and biocompatible polysaccharides, were studied to deliver molecules to the ocular surface, taking advantage of the mucoadhesiveness of HA to the eye mucosa. HA was incorporated into chitosan NPs to improve cellular targeting once this compound binds CD44 receptor, a receptor with enhanced expression in the human cornea and conjunctiva when inflammation is present, and can be efficiently internalized. This study, conducted by de la Fuente test the capacity of this nanosystems to transfect two cell lines derived from the human corneal and conjunctival epithelium and for that, the team used a plasmid that encode a reporter. The expression of a reporter was evaluated and results have shown increased expression and low cytotoxicity values for particle with major amount of HA (de la Fuente, Seijo et al., 2008; de la Fuente, Seijo et al., 2008; Tamboli, Mishra et al., 2011; Reimondez-Troitino, Csaba et al., 2015; Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015). Cationic NPs of chitosan and anionic charge of vitreous gel leads to an interaction and NPs cannot effectively transport therapeutic agents to the retina across vitreous barrier, a fact that can compromise the success of therapy. To overcome this problem, NPs of chitosan coated with an envelope of lipid bilayer were studied by Jiang because the negative charged lipid layer cloak the cationic nature of chitosan and allows a free diffusion of NPs into the vitreous gel, enhancing the transfection efficiency of particles. With this formulation was possible to achieve cellular uptake efficiency by multiples endocytosis pathways and highest transfection rates than with chitosan or lipid NPs alone (Jiang, Gan et al., 2012; Chaplot and Rupenthal 2014) and, latter, Gan studied the modification of the referred NPs with HA ligands. Cytotoxicity have been evaluated and chitosan NPs have shown to be more toxic than lipid-chitosan NPs, which, in turn, shown to be more toxic than HA-lipid-chitosan NPs and no changes of retinal morphology and ocular appearance were detected after intravitreal injections of this particles, evidencing the better biocompatibility exhibited by this type of vector (Gan, Wang et al., 2013; Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015).

4.4) Poly-L-lysine nanoparticles – CK30

CK30 NPs, made of a biodegradable 30-mer cationic polylysine (Fig. 8), have been extensively tested as a gene therapy vector, particularly the PEGylated conjugate CK30-PEG. This type of polymer doesn't encapsulate nucleic acids, as the majority of other polymers but neutralizes negative charges of DNA, making it neutral and causing condensation of the structure, that is DNase-resistant and easily endocytosed by cells. CK30-PEG NPs have

higher payload capacity compared with the other particles and can be presented with ellipsoidal or rod-like shape but, for ocular gene therapy, the most used was the second, that successfully transfect both RPE cells and PR while ellipsoidal particles only transfect RPE (Adijanto and Naash 2015; Mitra, Zheng et al., 2016). NPs of CK30-PEG enter in cells by a nucleolin-dependent endocytic process, which transport them directly to the nucleus, where plasmid can be expressed, factor that contributes to the higher effectiveness of this non-viral vector. In addition to being directly transported to the site where they act inside the cell, the NPs have easy synthesis process and present low cytotoxicity (Adijanto and Naash 2015).

To evaluate efficacy and safety profiles of compacted DNA NPs, plasmids that expresses the reporter eGFP were tested by Han into rod-shaped neutral-charged nanoparticles of CK30-PEG with the use of a specific RPE promotor VMD2 compared to the administration of naked DNA. The particles were administrated by repeated subretinal injections in postnatal mice and eGFP mRNA levels were higher for animals injected with NPs when compared to animals injected with naked DNA, proving that these NPs can be an effective vector for deliver genetic material into the eye. Anti-inflammatory response was also evaluated and no signals of immune response were detected, even for repeated administrations, when markers as macrophages, neutrophils and pro-inflammatory cytokines were quantified (Han, Koirala et al., 2012; Mitra, Zheng et al., 2016; Oliveira, Rosa da Costa et al., 2017).

These NPs have been associated with a long-term gene expression of the cargo-plasmid and because of that are a great option to treat chronic retinal degenerations as Stargardt's disease. Stargardt's disease is an autosomal recessive juvenile disorder caused by a mutation in a gene that encodes a PR ATP-binding cassette lipid transporter protein, ABCA4, expressed in PR. The mutation of ABCA4 gene leads, by a complex mechanism, to an abnormal production of A2PE, a phosphatidyl pyridinium diretinoid derivate, which, in normal situation, are engulfed by RPE cells and degraded to A2E by lysosomal enzymes. In pathology, RPE cells are not able to metabolize A2E, which accumulates as lipofuscin granules, leading to an excessive production of reactive oxygen species and, consequently, RPE degeneration. As RPE are important to structural and functional integrity of PR in macula, the damage spreads and vision loss occurs (Mitra, Zheng et al., 2016). An *in vivo* study of CK30-PEG NPs compacted with a human ABCA4 gene plasmid with a PR specific IRBP promotor injected by subretinal route in mice models of Stargardt's Diseases show a

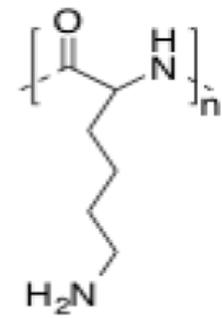


Fig. 8 – Chemical structure of Poly-L-lysine. Adapted from: (Bishop, Kozielski et al., 2015).

stably expression of the gene in retina and promote the phenotype of the disease (Han, Conley et al., 2012; Adijanto and Naash 2015; Mitra, Zheng et al., 2016).

Retinitis Pigmentosa is a group of disorders that affect retina leading to progressive vision loss and one of the causes of PR degeneration is a mutation in gene that encodes retinal degeneration slow protein, also called peripherin, expressed on the rims of rod and cone outer segment discs and its essential for the initial formation and subsequent maintenance of their structure. A mutation in the referred gene causes loss of function of the cells, being the base of the disease's development. A formulation of CK30-PEG NPs carrying a full-length therapeutic gene of normal peripherin gene driven by mouse rod opsin promotor was studied by Cai to successfully target PR and regress disease's phenotype. The results of the study were very satisfactory once produce elevated and stable levels of transgene expression in PR without activation of immune system and inflammatory response, and the formulation provide an effective therapy to improve retinal function and visual behaviour (Cai, Conley et al., 2010; Adijanto and Naash 2015; Mitra, Zheng et al., 2016).

4.5) Dendrimers

Dendrimers (Fig. 9) are NPs with a size between 1nm and 100nm (Alhalafi 2017) that have a symmetric three-dimensional structure composed of branched layers with a globular shape and consists of three major domains: the core, an atom or a molecule located at center, which is the synthetic starting point of dendrimer; the branching units, a series of monomers covalently attached to the core molecule which forms radially concentric layers; and the terminal

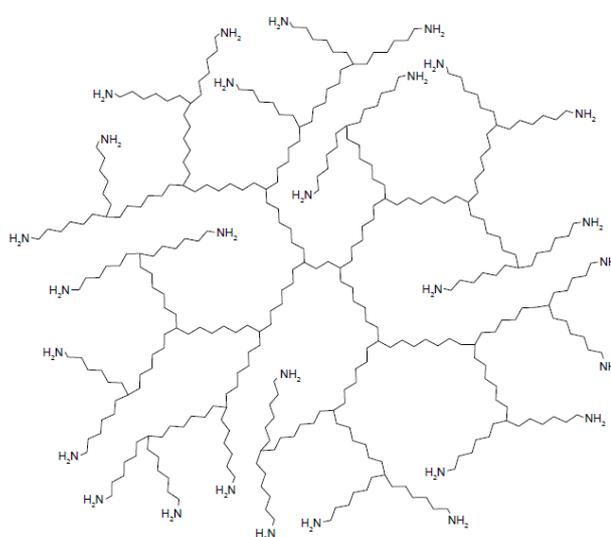


Fig. 9 – A schematic structure of a dendrimer. Adapted from: (Kalomiraki, Thermos et al., 2016).

functional groups, located at the surface of NP (Chaplot and Rupenthal 2014; Kalomiraki, Thermos et al., 2016). This branched spherical structure has internal cavities that can hold therapeutic agents and has been mainly used for the delivery of nucleic acids based drugs (Adijanto and Naash 2015; Reimondez-Troitino, Csaba et al., 2015), used in *in vitro* and *in vivo* models of gene therapy (Mitra, Zheng et al., 2016). This application of dendrimers is due

to the fact that, by using cationic surface groups, as primary amines (Adijanto and Naash 2015), they can condense with negatively charged DNA, protecting the genetic material from external nucleases degradation (Mitra, Zheng et al., 2016), however, primary amines generally are more toxic than secondary or tertiary amines and highly cationic systems may be cytotoxic and lead to NP aggregation (Chaplot and Rupenthal 2014; Mastorakos, Kambhampati et al., 2015).

The most studied dendrimers in ocular delivery are poly(amido amine) (PAMAM), PLL, polypropylenimines (PPI) (Reimondez-Troitino, Csaba et al., 2015) and PEI. PEI and PAMAM dendrimers are commonly used for retinal gene therapy because they can escape from endosomes by a 'proton sponge' mechanism (Adijanto and Naash 2015; Mitra, Zheng et al., 2016) – initially, the dendrimer-DNA complex is internalized by clathrin-mediated endocytosis and then, an endosomal electrostatic destabilization mechanism occurs, which leads to decelerated acidification of vesicle and increased accumulation of osmotically active Cl⁻ ions, with subsequent lyses of endosome and release of DNA into cytosol (Chaplot and Rupenthal 2014; Kalomiraki, Thermos et al., 2016). In other dendrimers, incorporating an inhibitor of endosomal acidification, as chloroquine, or fusogenic peptides, as hemagglutinin 2, the endosomal scape has been shown to be facilitated and, consequently, transgene expression increased (Chaplot and Rupenthal 2014; Adijanto and Naash 2015).

Into their cavities, dendrimers can encapsulate hydrophobic molecules while hydrophilic molecules can be connected to the surface as well as vectoring agents and, compared to linear polymers, dendrimers enables a high drug payload (Kambhampati and Kannan 2013), however, this class of NPs have cytotoxicity related to their chemistry because surface cationic groups of dendrimers can interact with negatively charged biological membranes (Alhalafi 2017).

The performance of these carriers can be enhanced by modifying their surface with PEGylation or acetylation, reducing their toxicity (Reimondez-Troitino, Csaba et al., 2015).

4.5.1) PLL dendrimers

One approach that has been used to modulate the expression of VEGF is a lipid-lysine dendrimer that deliver a sense oligonucleotide with anti-VEGF activity, ODN-I, into the choroidal lesions of a CNV animal model, via intravitreal injections (Kambhampati and Kannan 2013; Mitra, Zheng et al., 2016). These dendrimers have a lipophilic tail of lipoaminoacid groups, which may enhance diffusion across cellular membranes, and a polycationic head of polylysine, which allows complexation with DNA, and this structure gives to dendrimers interesting amphiphilic characteristics (Chaplot and Rupenthal 2014).

ODN-I acts by complementary to a section of sequence in the 5' untranslated region of VEGF and, by this way, inhibit the VEGF expression (Marano, Toth et al., 2005). This experiments not only reduced VEGF levels for a prolonged period and inhibited CNV development but also showed no apparent adverse effects or toxicity (Kambhampati and Kannan 2013; Chaplot and Rupenthal 2014; Hennig and Goepferich 2015; Kalomiraki, Thermos et al., 2016; Alhalafi 2017).

4.5.2) PAMAM dendrimers

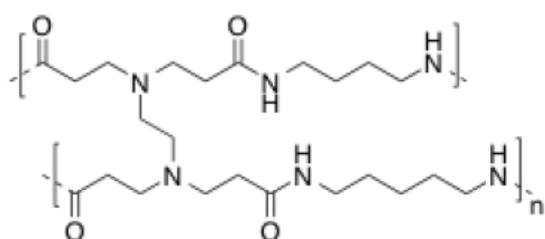


Fig. 10 – Chemical Structure of Poly(amido amine). Adapted from: (Bishop, Kozielski et al., 2015).

Poly(amido amine) (Fig. 10) dendrimers (PAMAM) have been used as non-viral gene delivery systems with promising results (Mastorakos, Kambhampati et al., 2015), having high transfection efficiency, water solubility characteristics, low immunogenicity and the amine terminal groups can be modified for binding a wide variety of molecules (Chaplot and Rupenthal 2014).

Despite its advantages, higher generations of PAMAM dendrimers, which presents a very cationic nature, have shown problems associated with cytotoxicity (Chaplot and Rupenthal 2014; Adijanto and Naash 2015; Oliveira, Rosa da Costa et al., 2017). To overcome this toxicity and to enhance tissue target, a number of surface modifications can be done, that includes carboxylic and hydroxyl surface groups, arginine ester rather than amide bonds, folate for targeting and PEG for increased circulation (Chaplot and Rupenthal 2014).

Polycationic dendrimers, as PAMAM dendrimers, may enable superior delivery and efficient cell transfection of siRNAs, complexing them and avoiding their enzymatic degradation. Kang develop a cell permeating PAMAM dendrimers by conjugating Tat (a cell permeating peptide) with antisense oligonucleotides, which shown efficient nuclear transfection (Kambhampati and Kannan 2013).

In an *in vitro* study conducted by Mastorakos to address the limitations of cationic PAMAM dendrimers, as amine-terminated dendrimers, hydroxyl-terminated dendrimers were used to transfect RPE cells and to demonstrate improved safety profile and effective plasmid compaction (Mitra, Zheng et al., 2016). In the synthesis of this NPs were used a base polymer with minimal amount of primary amine groups, which was substituted by hydroxyl groups, to minimize cytotoxicity; a nuclear localization signal to improve transfection, triamcinolone acetonide, which dilates the nuclear pore up to 60 nm when bound to its

receptor (Kambhampati and Kannan 2013); and a hydrophilic and near-neutral PEG coating to enhance colloidal stability and, consequently, prevent NPs aggregation, in physiological solutions (Mastorakos, Kambhampati et al., 2015; Oliveira, Rosa da Costa et al., 2017). Although this study did not test any molecule in particular for any disease of the eye, the favourable safety profile and the high transfection efficiency makes them a promising vehicle that can be applied to therapeutic gene delivery to RPE cells.

4.5.3) PEI dendrimers

PEI dendrimers are other type of NPs extensively used as non-viral gene carrier, especially for the delivery of pDNA. Despite the advantage of endosomal escape mentioned above, PEI dendrimers are less effective for siRNAs because with the reduced length of the nucleic acid a few electrostatic interactions occurs and the higher the molecular weight of PEI, the lower the dissociation ratio of nucleic acid in the cell. Thus, lower weight dendrimers are generally used because of the lower toxicity and complexation strength (Chaplot and Rupenthal 2014).

In an *in vivo* study conducted by Liao, PEI dendrimers have been tested to deliver an shRNA expressing pDNA to retinal ganglion cells of mouse by intravitreal injection (Adijanto and Naash 2015). A commercial vector expressing shRNA, designed to target melanopsin (a photopigment that mediate the light response of the photosensitive retinal ganglion cells) and a reporter were complexed into PEI particles and injected intravitreally. The results of this study showed successful transfected areas with expression of reporter, which show reduced melanopsin expression into undetectable levels (Liao and Yau 2007; Mitra, Zheng et al., 2016). With this study was possible to manipulate the expression of photopigments, which are involved in some ophthalmological diseases, giving to the patients a new hope for their treatment, although more specific studies are needed.

4.6) Others nanoparticles

Many other compounds have been incorporated into NPs and studied as non-viral vectors such as albumin, cationic hyperbranched poly(amino ester) (PAGA), dextran, gelatin and many others (Adijanto and Naash 2015; Solinis, del Pozo-Rodriguez et al., 2015; Zulliger, Conley et al., 2015), although with less relevance than the referred in this work.

An hybrid NP that combines cationized gelatin and the polyanions dextran sulphate and chondroitin sulphate was tested for ocular gene therapy to deliver a plasmid that

encodes a type of mucin, MUC5AC, that plays an important role in homeostasis of lacrimal fluid and whose production is reduced in Dry Eye Syndrome. The results shown an increased levels of the mucin on cornea and conjunctiva being a promising approach to the treatment of the disease. The combination of cationic and anionic compounds enables the manipulation of physicochemical parameters of NPs, allowing an improved toxicological profile without compromising the transfection of plasmid (Konat Zorzi, Contreras-Ruiz et al., 2011; Zorzi, Parraga et al., 2011; Zulliger, Conley et al., 2015; Mitra, Zheng et al., 2016).

Also NPs of hyperbranched polysaccharides have been study as vectors to deliver a siRNA that targets the p65 subunit of NF-kB, a subunit crucial for NF-kB activation, in human RPE cells. NF-kB play an important role in the angiogenesis of diabetic retinopathy, leading to a high expression of others angiogenic factors that leads to the disease. The polymers studied were glycogen and amylopectin and NF-kB p65 mRNA expression was efficiently suppressed by NPs (Liu, Gong et al., 2015).

The studies that mention polymers incorporating NPs to deliver genetic material are increasingly, and this type of vector seems to be extremely promisor, since the results obtained to the ophthalmic diseases are very satisfactory. However, their applicability to the treatment in humans with safety and long-term results remains unclear and more studies and trials are needed.

5) Conjugation with polyethylene glycol and hyaluronic acid

Many NPs described above were conjugated with PEG molecules. This modification of NPs can be advantageous once PEG can mask the positive charges of NPs that can lead to hydrophobic and electrostatic interactions with proteins, and posteriorly opsonisation of NPs or toxicity of formulation, unwanted results which may compromise the success of the therapy. The addition of PEG to the outer shell of particle forms a hydrophilic and neutral environment around it creating a protein-rejecting buffer, preventing the referred interactions and making the NPs more stable. In case of intravenous route, this can be particularly important once the half-time of NPs in the bloodstream was increased and macrophage uptake decreased (Zulliger, Conley et al., 2015). However, the addition of PEG to NPs seems to have a huge disadvantage: with the positive charges of particles masked, the interaction with cell membrane, crucial for transfection efficiency, can be impaired, as well as the ability to escape from endosomes (Martens, Remaut et al., 2015; Zulliger, Conley et al.,

2015). The “PEG dilemma”, as researchers call this problem, has been studied in an attempt to find a solution that does not compromise the therapy (Zulliger, Conley et al., 2015). PEGylation of NPs has been also used to improve the mobility in the vitreous body but, with the disadvantages described above, other alternative strategies have been studied. One of them, HA coat. HA is the major constituent of the vitreous body and, in addition to its capacity to bind CD44 receptors, as I referred above, it’s an interesting molecule to be used in ocular delivery. As a natural and biocompatible compound, HA can coat positively-charged NPs forming negatively-charged NPs that have increased mobility and diffusion in the vitreous body, preventing nanomedicines aggregation and immobilization, without compromising the ability to deliver the genetic material into target-cells (Martens, Remaut et al., 2015; Oliveira, Rosa da Costa et al., 2017).

6) Toxicity

The majority of studies about polymeric NPs used in ocular gene therapy focus efficacy assays and the safety data that exists is derived from these investigations. Hereupon, there is a lack of clinical information about the use of these therapies in humans and in animals, the information of *in vivo* toxicological concerns is uncomplete and there is a need of safety investigations.

In the studies that were presented in this work and where toxicity of the mentioned NPs was evaluated, cytotoxicity was quantified in terms of inflammatory response and/or opacity of different structures of the eye that shows aggregation of particles. Large part of these studies revealed good tolerance to the particles with low toxicity and immunogenicity, however, some studies revealed deleterious effects that can be related to the chemistry and structure of polymers, namely, molecular weight of polymer and the surface functionalized groups which confers an excessive positive charges to NPs. Also in dendrimers those characteristics are responsible for cytotoxicity, which could be attenuated by PEGylation or addition of hydroxyl groups to the surface of particles (Mastorakos, Kambhampati et al., 2015; Alhalafi 2017).

One *in vitro* study conducted by Lin had the purpose of compare the toxicity profile of three different polymeric NPs in two cell lines: human RPE cell line and primary human retinal vascular endothelial cells. The NPs evaluated were composed of PLGA, PCL and PEG-PLGA. The results of this study showed, as expected, lowest cytotoxicity values in both cells types for PEG-PLGA NPs and the highest values for PLGA NPs, evaluated in terms of

cell viability by a MTT assay. The difference of toxicity was attributed to the presence of PEG molecules in the structure of NPs with success results (Lin, Yue et al., 2016).

7) Conclusions

Finding the perfect vector for the delivery of nucleic acids to the eye structures has not been an easy task. Despite all the advancements in science over the last few years, it is imperative to follow the clinical trials sequence, being *in vivo* tests after *in vitro* experiments. Without the *in vitro* systematic evaluation of the question and *in vivo* experiments in animals models, in this case, the evaluation of the expression efficiency of the tested compound, preferentially with long-term expression, without severe cytotoxicity and with the route of administration that causes the lowest damage to the eye, is not possible to continue the researches to *in vivo* human models, and because of that, ocular gene therapy, actually, still one of the challenging areas in the science of biotechnology, that little by little is gaining new hope that one day, these NPs will be used to the treatment, cure or prevention of the most worrying eye disorders.

References

- Adijanto, J. and M. I. Naash (2015). "Nanoparticle-based technologies for retinal gene therapy." Eur J Pharm Biopharm **95**(Pt B): 353-367.
- Alhalafi, A. M. (2017). "Applications of polymers in intraocular drug delivery systems." Oman J Ophthalmol **10**(1): 3-8.
- Bishop, C. J., K. L. Kozielski, et al. (2015). "Exploring the role of polymer structure on intracellular nucleic acid delivery via polymeric nanoparticles." J Control Release **219**: 488-499.
- Cai, X., S. M. Conley, et al. (2010). "Gene delivery to mitotic and postmitotic photoreceptors via compacted DNA nanoparticles results in improved phenotype in a mouse model of retinitis pigmentosa." FASEB J **24**(4): 1178-1191.
- Chaplot, S. P. and I. D. Rupenthal (2014). "Dendrimers for gene delivery--a potential approach for ocular therapy?" J Pharm Pharmacol **66**(4): 542-556.
- Chaurasia, S. S., R. R. Lim, et al. (2015). "Nanomedicine approaches for corneal diseases." J Funct Biomater **6**(2): 277-298.
- Conley, S. M. and M. I. Naash (2010). "Nanoparticles for retinal gene therapy." Prog Retin Eye Res **29**(5): 376-397.
- de la Fuente, M., B. Seijo, et al. (2008). "Bioadhesive hyaluronan-chitosan nanoparticles can transport genes across the ocular mucosa and transfect ocular tissue." Gene Ther **15**(9): 668-676.
- de la Fuente, M., B. Seijo, et al. (2008). "Novel hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for ocular gene therapy." Invest Ophthalmol Vis Sci **49**(5): 2016-2024.
- Du, J., Q. S. Shi, et al. (2011). "Enhanced delivery of monomethoxypoly(ethylene glycol)-poly(lactic-co-glycolic acid)-poly L-lysine nanoparticles loading platelet-derived growth

factor BB small interfering RNA by ultrasound and/or microbubbles to rat retinal pigment epithelium cells." J Gene Med **13**(6): 312-323.

Gan, L., J. Wang, et al. (2013). "Hyaluronan-modified core-shell liponanoparticles targeting CD44-positive retinal pigment epithelium cells via intravitreal injection." Biomaterials **34**(24): 5978-5987.

Gomes dos Santos, A. L., A. Bochot, et al. (2006). "Oligonucleotide-polyethylenimine complexes targeting retinal cells: structural analysis and application to anti-TGFbeta-2 therapy." Pharm Res **23**(4): 770-781.

Han, Z., S. M. Conley, et al. (2012). "DNA nanoparticle-mediated ABCA4 delivery rescues Stargardt dystrophy in mice." J Clin Invest **122**(9): 3221-3226.

Han, Z., A. Koirala, et al. (2012). "Direct gene transfer with compacted DNA nanoparticles in retinal pigment epithelial cells: expression, repeat delivery and lack of toxicity." Nanomedicine (Lond) **7**(4): 521-539.

Hennig, R. and A. Goepferich (2015). "Nanoparticles for the treatment of ocular neovascularizations." Eur J Pharm Biopharm **95**(Pt B): 294-306.

Jiang, M., L. Gan, et al. (2012). "Cationic core-shell liponanoparticles for ocular gene delivery." Biomaterials **33**(30): 7621-7630.

Jin, J., K. K. Zhou, et al. (2011). "Anti-inflammatory and antiangiogenic effects of nanoparticle-mediated delivery of a natural angiogenic inhibitor." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(9): 6230-6237.

Kalomiraki, M., K. Thermos, et al. (2016). "Dendrimers as tunable vectors of drug delivery systems and biomedical and ocular applications." Int J Nanomedicine **11**: 1-12.

Kambhampati, S. P. and R. M. Kannan (2013). "Dendrimer nanoparticles for ocular drug delivery." J Ocul Pharmacol Ther **29**(2): 151-165.

- Koirala, A., R. S. Makkia, et al. (2013). "S/MAR-containing DNA nanoparticles promote persistent RPE gene expression and improvement in RPE65-associated LCA." Hum Mol Genet **22**(8): 1632-1642.
- Konat Zorzi, G., L. Contreras-Ruiz, et al. (2011). "Expression of MUC5AC in ocular surface epithelial cells using cationized gelatin nanoparticles." Mol Pharm **8**(5): 1783-1788.
- Kurosaki, T., M. Uematsu, et al. (2013). "Ocular gene delivery systems using ternary complexes of plasmid DNA, polyethylenimine, and anionic polymers." Biol Pharm Bull **36**(1): 96-101.
- Liao, H. W. and K. W. Yau (2007). "In vivo gene delivery in the retina using polyethylenimine." Biotechniques **42**(3): 285-286, 288.
- Lin, H., Y. Yue, et al. (2016). "Drug Delivery Nanoparticles: Toxicity Comparison in Retinal Pigment Epithelium and Retinal Vascular Endothelial Cells." Semin Ophthalmol **31**(1-2): 1-9.
- Liu, Z., H. Gong, et al. (2015). "Efficient delivery of NF-kappaB siRNA to human retinal pigment epithelial cells with hyperbranched cationic polysaccharide derivative-based nanoparticles." Int J Nanomedicine **10**: 2735-2749.
- Marano, R. J., I. Toth, et al. (2005). "Dendrimer delivery of an anti-VEGF oligonucleotide into the eye: a long-term study into inhibition of laser-induced CNV, distribution, uptake and toxicity." Gene Ther **12**(21): 1544-1550.
- Martens, T. F., K. Remaut, et al. (2015). "Coating nanocarriers with hyaluronic acid facilitates intravitreal drug delivery for retinal gene therapy." J Control Release **202**: 83-92.
- Mastorakos, P., S. P. Kambhampati, et al. (2015). "Hydroxyl PAMAM dendrimer-based gene vectors for transgene delivery to human retinal pigment epithelial cells." Nanoscale **7**(9): 3845-3856.
- Mitra, R. N., Z. Han, et al. (2014). "Synthesis and characterization of glycol chitosan DNA nanoparticles for retinal gene delivery." ChemMedChem **9**(1): 189-196.

- Mitra, R. N., M. Zheng, et al. (2016). "Nanoparticle-motivated gene delivery for ophthalmic application." Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol **8**(1): 160-174.
- Oliveira, A. V., A. M. Rosa da Costa, et al. (2017). "Non-viral strategies for ocular gene delivery." Mater Sci Eng C Mater Biol Appl **77**: 1275-1289.
- Park, K., Y. Chen, et al. (2009). "Nanoparticle-mediated expression of an angiogenic inhibitor ameliorates ischemia-induced retinal neovascularization and diabetes-induced retinal vascular leakage." Diabetes **58**(8): 1902-1913.
- Qazi, Y., B. Stagg, et al. (2012). "Nanoparticle-mediated delivery of shRNA.VEGF-a plasmids regresses corneal neovascularization." Invest Ophthalmol Vis Sci **53**(6): 2837-2844.
- Reimondez-Troitino, S., N. Csaba, et al. (2015). "Nanotherapies for the treatment of ocular diseases." Eur J Pharm Biopharm **95**(Pt B): 279-293.
- Seeley, R. R., T. D. Stephens, et al. (2003). Anatomy & physiology. Boston, McGraw-Hill.
- Singh, S. R., H. E. Grossniklaus, et al. (2009). "Intravenous transferrin, RGD peptide and dual-targeted nanoparticles enhance anti-VEGF intraceptor gene delivery to laser-induced CNV." Gene Ther **16**(5): 645-659.
- Solinis, M. A., A. del Pozo-Rodriguez, et al. (2015). "Treatment of ocular disorders by gene therapy." Eur J Pharm Biopharm **95**(Pt B): 331-342.
- Tamboli, V., G. P. Mishra, et al. (2011). "Polymeric vectors for ocular gene delivery." Ther Deliv **2**(4): 523-536.
- Zhang, C., Y. S. Wang, et al. (2010). "Inhibitory efficacy of hypoxia-inducible factor 1alpha short hairpin RNA plasmid DNA-loaded poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles on choroidal neovascularization in a laser-induced rat model." Gene Ther **17**(3): 338-351.

Zorzi, G. K., J. E. Parraga, et al. (2011). "Hybrid nanoparticle design based on cationized gelatin and the polyanions dextran sulfate and chondroitin sulfate for ocular gene therapy." Macromol Biosci **11**(7): 905-913.

Zulliger, R., S. M. Conley, et al. (2015). "Non-viral therapeutic approaches to ocular diseases: An overview and future directions." J Control Release **219**: 471-487.