



Joana Catarina Martins Ferreira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “CRISPR/Cas9 na produção de modelos de doença do cérebro” referentes à unidade curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dra. Inês Loureiro, Dra. Catarina Madanêlo e do Professor Doutor Luís Almeida 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

Joana Catarina Martins Ferreira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “CRISPR/Cas9 na produção de modelos de doença do cérebro” referentes à unidade curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dra. Inês Loureiro, Dra. Catarina Madanêlo e do Professor Doutor Luís Almeida 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

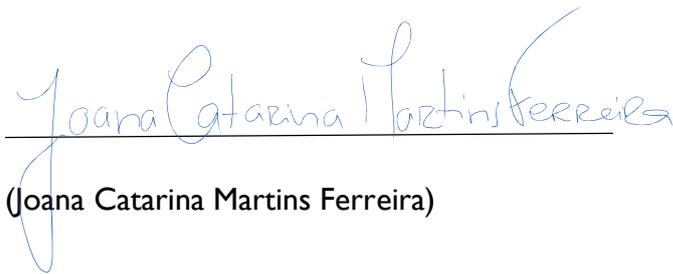


UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Joana Catarina Martins Ferreira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2012149254, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo dos Documentos Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “CRISPR-Cas9 na produção de modelos de doença do cérebro.” apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 1 de setembro de 2017.



Joana Catarina Martins Ferreira

(Joana Catarina Martins Ferreira)

Agradecimentos,

À Faculdade de Farmácia pela formação e preparação prestadas;

À Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A, à Dra. Catarina Madanêlo e restante equipa,
pela oportunidade e por todos os ensinamentos;

À Farmácia da Mata Real, à Dra. Inês Loureiro e restante equipa pela oportunidade e
orientação;

Ao Professor Doutor Luís Almeida pela disponibilidade e apoio demonstrado;

Aos meus pais, irmão e família por sempre acreditarem em mim, e assim, nunca me
deixarem esmorecer;

Aos meus amigos pelo companheirismo, nos melhores e nos piores momentos;

A todos, um muito Obrigada.

“Education is not the learning of facts, but the training of the mind to think.”

Albert Einstein

Índice

PARTE I: Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária	1
Lista de Abreviaturas	2
1. Introdução	3
2. Farmácia da Mata Real.....	4
3. Análise SWOT	4
3.1 Análise Interna.....	5
3.1.1 Pontos Fortes.....	5
3.1.2 Pontos fracos.....	6
3.2 Análise Externa.....	7
3.2.1 Oportunidades.....	7
3.2.2 Ameaças.....	8
4. Casos Práticos.....	9
5. Considerações finais	11
Referências Bibliográficas	12
ANEXOS	14
PARTE II: Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica	19
Lista de Abreviaturas	20
1. Introdução.....	21
2. Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A	22
2.1 Departamento de Assuntos Regulamentares e Farmacovigilância.....	22
3. Análise SWOT	23
3.1 Análise Interna.....	24
3.1.1 Pontos Fortes.....	24
3.1.2 Pontos Fracos.....	25
3.2 Análise Externa.....	25
3.2.1 Oportunidades.....	25
3.2.2 Ameaças.....	27
4. Casos práticos.....	28
5. Considerações finais	29
Referências Bibliográficas	30
Anexos	32
PARTE III: CRISPR/Cas9 na produção de modelos de doenças do cérebro	36
Resumo	38
Abstract	39

Introdução	40
2. Nucleases programáveis como ferramentas de edição precisa do genoma	41
2.1. Quebra dupla das duas cadeias de DNA (DSBs) como estratégia para a edição genómica precisa.	41
2.1.1 NHEJ.....	41
2.1.2 Reparação homóloga - HDR.....	42
2.2 Meganucleases; ZFNs; TALENs.....	43
2.3 CRISPR-Cas.....	44
3. Origem e biologia do Sistema CRISPR-Cas.....	44
4. CRISPR-Cas 9 (Tipo II)	45
4.1 Organização estrutural e arquitetura da Cas 9 e variantes.....	47
4.2 PAM (do Inglês, Protospacer Adjacent Motif).....	49
4.3 Edição com CRISPR-Cas9.....	50
4.4 Métodos de entrega dos reagentes CRISPR.....	51
4.5 Especificidade e eficiência da nuclease Cas9.....	53
5. Utilizações da CRISPR no domínio das neurociências.....	54
5.1 Modelos celulares	55
5.2 Modelos animais.....	56
5.2.1. Roedores.....	57
5.2.2. Primatas não humanos	57
5.3 Uso do Sistema CRISPR para gerar modelos de doenças neurodegenerativas, em primatas	58
5.4 CRISPR e os passos para a meta de interesse: modelos de doenças do cérebro.....	60
6. Limitações/ Desafios da CRISPR na produção de modelos de doença do cérebro.....	61
6.1. Potencial off-target	61
6.2 Mosaicismo.....	62
6.3 Mecanismo de reparação por homologia ineficiente em neurónios	63
6.4 Limitação dos mecanismos de entrega no cérebro	64
7. Conclusão	64
Referências Bibliográficas.....	66
ANEXOS	73

PARTE I: Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas

FMR	Farmácia da Mata Real
ARSN	Administração Regional de Saúde do Norte
SWOT	Strengths, weaknesses, opportunities and threats
SNS	Sistema Nacional de Saúde
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
FEFO	First Expire - First Out
MSRM	Medicamentos Sujeitos a Receita Médica
CGD	Caixa Geral de Depósitos
PDCA	Plan, Do, Check and Act

I. Introdução

O direito à saúde é um direito fundamental e que se patenteia de enorme importância no que concerne à agregação de qualidade e valor à vida, assim, por definição justa, o farmacêutico é um profissional ao serviço da vida.^{1,2} Apesar disto, a importância da intervenção farmacêutica é, muitas vezes, desconsiderada, pelo que a eficácia e profissionalismo do serviço prestado na farmácia pelo especialista do medicamento devem afirmar-se, quer através do papel de técnico do medicamento, quer ainda da vertente humana, capaz de aconselhamento e fidelização da pessoa doente, inspirando uma confiança necessária à afirmação do papel de agente de saúde pública, na sociedade. Desta forma, entende-se a presença constante e obrigatória do farmacêutico, em cada farmácia, visando a demonstração da competência, do profissionalismo e da sensibilidade em cada prestação de serviço.^{1,3,4}

Vale ainda ressaltar, que devido ao “empowerment” que a população tem vindo a ganhar há a reconstrução da política de saúde onde se prevê, agora, um maior envolvimento do doente, num grau de literacia crescente que pretende ver no farmacêutico, uma fonte confiável para decisões informadas, no que concerne aos cuidados de saúde. Assim, há notavelmente, uma necessidade de renovação e reafirmação da figura do farmacêutico, que deve ser capaz de corresponder a novas demandas e exigências.⁵

A formação universitária na área do medicamento é, naturalmente, complementada pelo exercício prático em contexto profissional, através da realização de um estágio em farmácia comunitária. Deste exercício quotidiano resulta além da experiência, que é preocupação primária no início do caminho profissional, a consolidação e/ou aquisição de conhecimentos específicos, que detêm enorme importância no objetivo comum de todos os profissionais de saúde, bem como de todos os Governos: a segurança e qualidade de vida.

O meu estágio na componente de Farmácia Comunitária foi realizado na Farmácia da Mata Real, em Paços de Ferreira, sob a orientação da Dra. Inês Loureiro, e com a colaboração de toda a sua equipa.

O presente relatório visa a avaliação deste processo formativo, permitido pelas longas horas de estágio. Assim, é imperativo uma análise sistemática, levada a cabo por uma ferramenta já popularmente conhecida, a Análise SWOT. Esta análise sedimenta quais os meus pontos fortes e fracos (análise interna) na performance desempenhada e que favoreceram, portanto, a aquisição de *know-how*, e quais as oportunidades e ameaças que

decorreram da realização deste estágio (análise externa), independentes do âmbito pessoal.

2. Farmácia da Mata Real

A Farmácia da Mata Real (FMR) localiza-se em Paços de Ferreira, e tem como proprietária indissociada da direção Técnica, a Doutora Inês da Costa e Silva Loureiro.

No que concerne à sua localização é privilegiada, rodeada por uma zona habitacional e comercial, nomeadamente, uma clínica veterinária e dentista.

O horário de atendimento é das 9h às 19:30h, de segunda a sexta e das 9h às 13h ao sábado. Nos dias pré-estabelecidos pela Administração Regional de Saúde do Norte (ARSN) a farmácia encontra-se em serviço permanente, e, neste caso, as portas encontram-se abertas até às 23h, hora a partir da qual o atendimento passa a ser feito por um postigo de atendimento, até às 9h do dia seguinte.

Esta farmácia prima pela fidelização dos utentes, tendo já um leque alargado de utentes habituais. Além da dispensa dos medicamentos, está nos objetivos desta entidade, a constante intervenção farmacêutica que visa, em lugar de honra, a segurança do doente.

As atividades que desenvolvi neste estágio consagram-se na aquisição da postura em contexto profissional, desde a gestão em *back office* até ao atendimento e aconselhamento em balcão, podendo as mesmas ser enumeradas da seguinte forma: introdução do dia-a-dia de uma Farmácia Comunitária; elaboração, receção e conferência das encomendas; arrumação dos medicamentos e outros produtos de saúde segundo a regra FEFO (First Expire – First Out); participação no controlo do prazo de validade dos medicamentos e produtos de saúde; medição dos parâmetros bioquímicos; preparação de medicamentos manipulados; atendimento ao balcão, participando do aviamento de receitas médicas mas também na prestação de serviços como a indicação farmacêutica para resolução de casos *minor*; observação e participação dos processos de registo de entradas e saídas de medicamentos Psicotrópicos e Estupefacientes e ainda observação e participação do processo de conferência do receituário e respetiva faturação às entidades.

3. Análise SWOT

A análise de SWOT (**Tabela I**) é uma ferramenta de gestão, que permite indagar acerca de fatores internos (Pontos Fortes e Pontos Fracos) e externos (Oportunidades e Ameaças) que são preponderantes e influenciam quer o delineamento estratégico, quer a tomada de decisões.^[6]

Inicialmente, esta abordagem foi desenvolvida para as empresas/indústrias, como elemento chave na gestão, permitindo de forma simples e concisa um posicionamento estratégico,

auferindo vantagens competitivas e cultivando uma visão de melhoria contínua, no entanto, rapidamente, se popularizou nas mais diversas vertentes, sendo muito útil também a nível pessoal/educacional, como uma perspetiva de auto-avaliação, permitindo um melhor proveito dos talentos, corrigindo eventuais fraquezas e não perdendo de vista quer as oportunidades que possam potenciar a carreira/desenvolvimento pessoal, quer aquilo que pode atrapalhar. [7].8]

O presente relatório é uma versão da análise SWOT pessoal (**Tabela 2**), servindo o presente como objeto de avaliação do resultado do estágio desenvolvido, sinalizando os aspetos mais relevantes que favoreceram ou dificultaram a aprendizagem. Em simultâneo, efetua-se a distinção entre as dimensões de ordem pessoal e individual (Análise Interna) e as dimensões correlacionadas com a organização, dinâmica funcional do departamento, perfil/características da orientadora, entre outros (Análise Externa).^[9]

Tabela 1 Exemplificação da Análise SWOT pessoal a desenvolver

	Favorecedores (da aprendizagem)	Dificultadores (da aprendizagem)
Análise Interna (âmbito pessoal)	Forças (Strenghts) S	Fraquezas (weaknesses) W
Análise Externa (âmbito organizacional)	Oportunidades (opportunities) O	Ameaças (Threats) T

3.1 Análise Interna

A análise interna reporta às dimensões de ordem pessoal e individual, que podem favorecer ou fragilizar determinados eventos, neste caso, o desenvolvimento do estágio.

3.1.1 Pontos Fortes

A nível pessoal, os pontos fortes, e, portanto, favorecedores da aprendizagem no desenvolver do estágio curricular foram os seguintes:

- Formação superior em unidades curriculares como Farmacologia, Fisiopatologia, Intervenção Farmacêutica, Organização e Gestão Farmacêutica, bem como a opcional de Acompanhamento Farmacoterapêutico em Cuidados de Saúde Primários, visto que são um suporte imprescindível para a conclusão das tarefas e desafios diários da farmácia, desde o funcionamento em *back office*, onde a Organização e Gestão Farmacêutica impacta bastante, como por exemplo, as técnicas de gestão/arrumação (“First Expire, First Out” ^[10]) até ao atendimento em balcão, onde os conhecimentos farmacológicos aliados à capacidade de resolução clínica de situações *minor* são valências de destaque;

- Capacidade de trabalho em equipa e em ambiente aberto, o que é fundamental para a manutenção da dinâmica e a minimização do constrangimento numa equipa já formada, vendo, em conjunto, o “golo” da segurança do doente;
- Capacidade de organização e gestão seja documental ou de espaço físico, o que surge como imperativo em tarefas como a gestão de encomendas, de faturas, guias de remessa, notas de crédito, registo de entradas de benzodiazepinas/psicotrópicos, devoluções, arrumação dos medicamentos e produtos de saúde em gavetas deslizantes por ordem alfabética, dosagem e apresentação;
- Motivação e empenho, o que é característico do primeiro contato em contexto profissional, principalmente, no que concerne à patenteação do farmacêutico como agente de saúde pública, primando por uma intervenção farmacêutica notada e com rigor.

3.1.2 Pontos fracos

Relativamente à análise interna, os pontos fracos que prejudicaram a fluidez do estágio curricular, mas que serviram como catalisadores de oportunidades de melhoria contínua foram:

- Dificuldade inicial de associação de nomes comerciais com os princípios ativos, bem como a multiplicidade de apresentações existentes de um mesmo produto;
- Lacunas na formação académica. Apesar da multiplicidade de assuntos abordados nas inúmeras unidades curriculares frequentadas, áreas como a dermocosmética e as preparações de uso veterinário, não conseguiram transpor os conceitos teóricos para a realidade da farmácia comunitária, o que pode ter limitado a minha atuação/conselho farmacêutico, numa das áreas com maior espaço de manobra para a intervenção farmacêutica e que constituem uma maior fonte rentabilidade num espaço comercial ao qual se tem vindo a impor a necessidade da aposta nos produtos de *consumer health care* para suportar as descidas de preço e de margens dos MSRM;
- Dificuldade inicial no que concerne à faturação a entidades diferentes do SNS (Anexo 1), devido ao procedimento especial que é exigido. Existe uma panóplia de entidades envolvidas na comparticipação dos medicamentos, no entanto, a entidade *major* trata-se do Sistema Nacional de Saúde (SNS) e dos seus subsistemas. Outras entidades participadoras são a CGD (Caixa Geral de Depósitos) e, ainda, outros subsistemas que atuam em complementaridade com o SNS. Além disto, preconiza-se ainda a existência de uma série de diplomas que regem as comparticipações especiais no receituário relativamente a

medicamentos específicos no tratamento de determinadas patologias. Nestes casos, os prescritores têm que enunciar a Portaria ou Despacho na receita médica para que o utente tenha uma percentagem de comparticipação superior à referente ao sistema de saúde do qual é beneficiário (Anexo 2). É, portanto, necessário obedecer a determinadas regras sob pena de devolução do receituário.

- Dificuldade inicial na interpretação (caligrafia) de receitas manuais;

3.2 Análise Externa

A análise externa reporta às dimensões externas correlacionadas com a organização, dinâmica funcional do departamento, perfil/características da orientadora, bem como as tarefas desenvolvidas.

3.2.1 Oportunidades

Relativamente, ao ambiente externo, as oportunidades que surgiram, independentemente, da minha performance, e que se encaixam em aspetos positivos e favorecedores de aprendizagem seja ela prática ou teórica, são:

- Oportunidade de atuação em contexto profissional, no dia-a-dia de uma farmácia, sujeita aos desafios e responsabilidades inerentes ao exercício profissional, o que resulta na acumulação de experiência, novos conhecimentos e/ou consolidação de outros, bem como o contato com outros profissionais (farmacêuticos, técnicos, ajudantes de farmácia e delegados de informação médica), que prontamente se dispõem a auxiliar na resolução dos desafios e aprendizagens diárias. Assim se patenteia a importância da comunicação e do desenvolvimento desta *soft skill* em prol de uma postura capaz de integrar numa equipa;

- Contato com o SIFARMA 2000®, um software informático farmacêutico^[11] que confere inúmeras vantagens (Anexo 3), logo precocemente, na valorização do utente, que deve ser o foco desde o início de qualquer atendimento. Assim, esta ferramenta possibilita a gestão de utentes através da criação de uma ficha para posterior seguimento farmacoterapêutico, o que segundo o Manual Sifarma 2000 (2010) permite uma prestação de serviços individualizada. Este *upgrade* responde à necessidade de encarar o farmacêutico como agente de saúde pública e não meramente especialista do medicamento, contribuindo para a diferenciação da farmácia. Além disto, este software permite a gestão de encomendas e de stock, controlo dos prazos de validade, fecho do dia e da caixa, fecho e faturação para os diversos organismos de comparticipação, gestão de devoluções e consulta da informação técnica do medicamento;

- Desenvolvimento da vertente humana e social, com aumento da capacidade de lidar com diferentes tipos de doentes/utentes, o que se torna uma *soft skill* importante, nomeadamente,

no atendimento ao público, clientes, fornecedores, entre outros. Isto contribui para um aumento da fluência e confiança na comunicação com uma multiplicidade de actores;

- Oportunidade de preparação de manipulados (Anexo 4), nomeadamente, suspensão oral de trimetropim a 1%; solução alcoólica 60° de ácido bórico à saturação e solução de propilenoglicol (50%/50%) o que permite uma aquisição de prática na manipulação, aplicação de conhecimentos de galénica e tecnologia farmacêutica, bem como ver o outro lado da farmácia de oficina, onde se preparam fórmulas magistrais ou oficinais que colmatam as lacunas das especialidades existentes e adequam para o doente em causa. Mediante a preparação são responsabilidades do farmacêutico verificar a qualidade da preparação, “observando para efeito as boas práticas” e ainda a segurança, nomeadamente no que concerne à dose, substâncias ativas e interações.^[12]

- Formações de dermocosmética, que me permitiram colmatar algumas das fragilidades nesta área de atuação (ex: Formações da Piérre-Fabre, Formações da OmegaPharma (Anexo 5) e da Bioderma), bem como o resultado de uma parceria da FMR, com uma clínica de estética e bem-estar, me permitiu aprender mais sobre estética e cosmética, a ainda da sinergia do procedimento estético mecânico com os produtos de saúde disponibilizados na farmácia;

-Oportunidade de acompanhar rastreios de nutrição e audição, como ações de promoção gratuitas que a FMR disponibiliza, o que instigou novo conhecimento.

3.2.2 Ameaças

Quanto às ameaças, ou seja, fatores negativos despoletados, independentemente, da minha performance e que podem resultar em desvantagens, futuramente, devo mencionar os seguintes:

- Aquisição de vícios de trabalho, nomeadamente, no que concerne à metodologia e ritmo de trabalho, o que pode impactar negativamente num ambiente de trabalho distinto, por exemplo, com outra metodologia de organização. É de notar, que a FMR rege-se pela mesma organização e delegação de tarefas desde o seu início, o que, de alguma forma, pode conferir uma desvantagem em relação a locais de trabalho com outros métodos mais recentes e voltados para a rentabilidade como o Método de Kaizen^[13], que se apoia na filosofia base do ciclo PDCA (*Plan, Do, Check e Act*) que visa a melhoria contínua, o que percebemos pela decomposição da palavra: KAI= mudar e ZEN= melhor. Uma farmácia que aposte neste espírito de qualidade, prepara os seus formandos para um pensamento crítico, metódico e estratégico na resolução de desafios. Assim, desenvolvem skills muito valorizadas num mercado altamente competitivo; (Anexo 6)

- Contato, unicamente, com o Sifarma 2000 e com as facilidades/utilidades que ele comporta, o que pode cultivar uma atitude descaramento no que concerne às posologias, indicações, interações, bem como toda a restante informação científica, fácil, rápida e comodamente acessíveis neste software farmacêutico;

- Público- alvo limitante no que se refere ao espaço/tempo de intervenção farmacêutica, pelo que não se denota um empoderamento do doente em relação ao seus cuidados de saúde, o que resulta numa ameaça à aprendizagem, nomeadamente, à capacidade de aconselhamento farmacêutico. Traduzindo isto, ainda existem utentes que procuram na farmácia um atendimento rápido, não valorizando e dispensando qualquer tipo de aconselhamento que o farmacêutico se disponha a fazer. Esta atitude foi uma ameaça sentida no decorrer do estágio no que concerne à lapidação da performance de aconselhamento farmacêutico.

Tabela 2 Análise SWOT pessoal decorrente do estágio curricular em Farmácia Comunitária

S	W
<ul style="list-style-type: none"> -Formação superior -Trabalho em equipa e em ambiente aberto -Organização e gestão -Motivação e empenho 	<ul style="list-style-type: none"> -Associação de nomes comerciais com os princípios ativos, bem como a multiplicidade de apresentações -Lacunas na formação académica, (ex: dermocosmética, preparações de uso veterinário) -Dificuldade na faturação a entidades diferentes do SNS -Dificuldade inicial na interpretação (caligrafia) de receitas manuais
O	T
<ul style="list-style-type: none"> -Atuação em contexto profissional -SIFARMA 2000 -Vertente humana e social -Preparação de manipulados -Formações de dermocosmética -Rastreios de nutrição e audição 	<ul style="list-style-type: none"> -Vícios de trabalho -Facilidades do SIFARMA 2000 e descaramento de aspetos importantes na toma de medicamentos (posologia, interações, entre outros) -Público- alvo limitante no que se refere ao espaço/tempo de intervenção farmacêutica

4. Casos Práticos

- I. Uma senhora idosa apresenta-se na farmácia com uma prescrição eletrónica de acetilcisteína, exclusivamente. Como em qualquer atendimento, e, porque a intervenção farmacêutica deve ser notada e consciente, questionei-a sobre a forma da tosse a sua duração. Perante isto, a senhora mostrou-se desesperada afirmando ser uma tosse tão seca, que a estava a deixar com dores musculares na parte superior e que já tinha sido causa de vários vômitos. Assim, intrigada questionei-a se tinha começado a fazer alguma nova medicação, ao que me respondeu que “que se recordasse não”, não fazendo qualquer associação. Para confirmar a

situação consulte a ficha do doente, quando averigui que no mês passado tinha levado, pela primeira vez, uma embalagem de Perindopril para controlo da tensão arterial, descobrindo assim a causa para a tosse seca persistente. Apresentando-lhe a embalagem do anti-hipertensor, a senhora recordou-se, que efetivamente, tinha começado esse medicamento, e por esforço de memória conseguiu, assim, associar o aparecimento da tosse. Expliquei-lhe, que o grupo deste medicamento, um inibidor de enzima conversora da angiotensina tem como principal efeito secundário a tosse seca e que para resolver a sua situação deveria ir ao médico, relatar-lhe o sucedido e pedir-lhe para lhe trocar o anti-hipertensor. Assim, desta forma, a senhora ficou aliviada, pois, pensou que se trataria de uma situação clínica grave, pelo facto de não cessar a tosse.

- II. Uma senhora apresenta-se na farmácia com uma guia onde se encontrava manualmente prescrito: Pevaryl pó®; Pevaryl solução® e Betadine Espuma®. Assim, comecei por explicar como deveria proceder no tratamento com o anti-fúngico, explicando, ainda, que o Pevaryl Pó® é utilizado para complementar a terapêutica com o Pevaryl Solução® para pulverização, como tratamento auxiliar e/ou profilático. Aconselhei a deixar secar antes de cobrir a zona pulverizada, bem como a utilizar meias de algodão e/ou calçado aberto ou arejado, e na impossibilidade disto, deve sempre pulverizar também o calçado e a meia durante o tratamento. No final, questionei-a sobre a necessidade do Betadine Espuma, ao qual a senhora me referiu destinar-se à inflamação entre os dedos. Na dispensa, questionei-a se a pessoa em causa teria problemas de tiroide, ao qual me respondeu prontamente que sim, e que tinha terminado um tratamento, há cerca de 2 dias. Assim, desta forma, alertei-a sobre a interferência da iodopovidona, constituinte ativo do Betadine, nos níveis de iodo, por exposição prolongada, em zonas de pele fragilizada, onde mais facilmente existe permeação e absorção sistémica. Perante esta explicação, a senhora disse que não arriscaria. Assim, aconselhei Avène Cicalfate Loção Secante Reparadora que com propriedades antibacterianas, cicatrizantes e secantes, evita a transpiração, minimizando a condição intertrigem, inflamação resultante da fricção, calor e humidade entre pregas da pele, por exemplo.

5. Considerações finais

Terminado o estágio curricular em farmácia comunitária recordo um caminho enriquecedor que se evidencia não só na oportunidade de aplicação dos conhecimentos teóricos aprendidos ao longo do MICF como, mais importante que isso, na aquisição de novos conhecimentos que resultam, única e exclusivamente, da prática farmacêutica, bem como a lapidação da postura em contexto profissional.

De maneira geral, foi uma superação diária: desde a aquisição de método de trabalho, à inclusão na equipa de trabalho, à demonstração de confiança no aconselhamento farmacêutico, à capacidade de lidar com diferentes tipos de pessoas com diferentes tipos de reconhecimento pela figura do farmacêutico, entre outros.

Com o desenrolar do estágio fui sendo sensibilizada para a figura do farmacêutico enquanto agente de saúde pública, principalmente, numa população-alvo com baixo *empowerment* sobre os cuidados de saúde. Assim, a intervenção farmacêutica contribui, ativamente, para o uso racional da medicação, a segurança e a qualidade de vida do doente, bem como ainda se traduz, financeiramente, numa poupança ao Estado, no que se refere a hospitalizações, segundas consultas e nova medicação comparticipada. De forma prática, o principal objetivo da comunitária é a cedência dos medicamentos nas condições que minimizem os riscos associados ao seu uso, ou seja, a redução da elevada morbimortalidade associada aos medicamentos.^[14:15] Efetivamente, para alcançar o descrito, anteriormente, é imperativo uma atualização técnico-científica constante. Para mim, esta consciencialização prática, mediante os desafios e preocupações diárias enquanto profissional de saúde, agiu como catalisadora de uma motivação extra no que concerne a aprender e saber mais, para poder aconselhar e cuidar melhor.

A realização de uma análise sistemática é fundamental como objeto de avaliação. A avaliação é motor de consolidação e de melhoria contínua. Com a consciência dos meus pontos fortes e das minhas dificuldades intrínsecas, bem como das oportunidades geradas, a par ainda das ameaças que se podem despoletar, apresento-me apta a usufruir melhor de um segundo contato profissional, caminhando no sentido de a cada experiência me melhorar enquanto farmacêutica.

Referências Bibliográficas

1. Farmácia Comunitária, Ordem dos Farmacêuticos em http://www.ordemfarmaceuticos.pt/scid//ofWebInst_09/defaultCategoryViewOne.asp?categoryId=1909 consultado em 26/04/2017
2. Declaração Universal dos Direitos Humanos em http://www.ohchr.org/EN/UDHR/Documents/UDHR_Translations/por.pdf , consultado em 26/04/2017
3. A farmácia e o medicamento em Portugal nos últimos 25 anos, João Rui Pita
4. Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos em http://www.ordemfarmaceuticos.pt/xFiles/scContentDeployer_pt/docs/Doc10740.pdf consultado em 26/04/2017
5. Empowerment dos doentes, em http://www.eu-patient.eu/globalassets/campaign-patient-empowerment/leaflet/portugese_pe-campaign-leaflet_final.pdf , consultado em 26/04/2017
6. “SWOT Analysis - Do It Properly!” disponível em: <https://www.strategicmanagementinsight.com/tools/swot-analysis-how-to-do-it.html>, última consulta em: 28/01/2017;
7. “Section 14. SWOT Analysis: Strengths, Weaknesses, Opportunities, and Threats”, disponível em <http://ctb.ku.edu/en/table-of-contents/assessment/assessing-community-needs-and-resources/swot-analysis/main>, última consulta em 28/01/2017;
8. “SWOT Analysis: Discover New Opportunities, Manage and Eliminate Threats”, disponível em https://www.mindtools.com/pages/article/newTMC_05.htm, última consulta em: 28/01/2017
9. Pereira, Rui Pedro Gomes; Rito, Maria (2013), A análise SWOT como estratégia de (auto) avaliação : uma partilha de experiências em contextos de prática clínica supervisionada. Última consulta em: 28/01/2017
10. Regra FEFO em <http://www.quali.pt/glossario/fefo-first-expire-first-out> consultado em 27/04/2017
11. Manual Sifarma 2000 em <https://www.scribd.com/doc/140773552/Manual-Sifarma-2000> , consultado em 28/04/2017
12. Decreto-Lei n.º 95/2004 de 22 de Abril, artigo 4º Farmacêutico
13. Metodologia KAIZEN em <https://pt.kaizen.com/home.html>, consultado em 01/07/2017
14. Boas Práticas Farmacêuticas para a farmácia comunitária (BPF) 3ª Edição (2009)

15. Baena, M.I., Problemas Relacionados con los Medicamentos como causa de consulta en el servicio de urgencias del hospital universitario virgen de las nieves de granada. 2004, Universidade de Granada: Granada

ANEXOS

Anexo I Organismos de Faturação.

	Código Organismo	Organismo de Faturação
Inseridos no Sistema Nacional de Saúde	01	S.N.S – Regime Geral
	48	S.N.S – Pensionistas
	45	S.N.S - Diplomas
	49	S.N.S – Pensionistas Diplomas
	47	S.N.S – Manipulados
	41	S.N.S – Doenças profissionais
	42	S.N.S - Paramiloidose
	46	S.N.S – Trabalhadores Migrantes
	67	S.N.S – Lupus/hemofilia/hemoglobinopatias
	DS	S.N.S – Diabetes
	DE	S.N.S- Câmaras Expansoras
	DO	S.N.S – Ostomia
	LA	S.N.S- Pensionistas Ind. Lanifícios
Outros	RI	Caixa Geral de Depósitos- SNS
	R2	CGD – SNS Diplomas
	R3	CGD – Pensionistas
	FM	Fidelidade – Companhia de seguros SA
	SI	Generali – Seguro
	LS	Liberty Seguros SA
	AA	SAVIDA - SNS
	AC	SAVIDA - SNS Pensionista

Anexo 2 Comparticipação Especial através de Portarias e Despachos para patologias específicas

Legislação	Indicação Terapêutica	Comparticipação especial
Despacho 21094/1999	Psicose maníaco-depressiva	100% no carbonato de lítio quando prescrito por neurologista ou psiquiatra
Portaria 141/2017	Artrite Reumatóide, AU, AP	100% em metotrexato e leflunomida quando prescrito por reumatologista ou medicina interna
Despacho 1234/2007	Doença inflamatória intestinal	90 % em todos os medicamentos presentes na lista em anexo ao Despacho 1234/2007 de 29 de dezembro de 2006 quando prescritos por especialista
Portaria 329/2016	Dor Crónica	90% dos medicamentos listados em anexo à Portaria 329/2016
Portaria 331/2016	Dor oncológica	90% dos medicamentos listados no anexo à Portaria 331/2016

Despacho 10910/2009	Infertilidade	69% em todos os medicamentos referidos na lista em anexo ao Despacho 10910/2009 de 23 de abril
Lei 6/2010	Psoríase	90% em todos os medicamentos da psoríase listados na lei 6/2010, de 7 de maio
Despacho 13020/2011	Doença de Alzheimer	37% nos medicamentos referidos no anexo a despacho 13020/2011 de 20 de setembro
Despacho 5635-A/2014	Ictiose	90% nos medicamentos listados neste despacho quando prescritos por dermatologista

Anexo 3 Lista de algumas potencialidades do software instalado na FMR com as quais contatei.

POTENCIALIDADES DO SIFARMA 2000
Atendimento com e sem participação
Informação científica dos medicamentos
Geração de encomendas, aprovação e envio aos fornecedores
Receção de encomendas
Gestão de stocks
Organização da faturação nos respetivos lotes de trinta receitas
Gestão de prazos de validade
Recolha de quebras
Criação da ficha do cliente em acompanhamento farmacoterapêutico

Anexo 4 Ficha de Preparação do Manipulado

Manipulado: Suspensão Oral de Trimetropim a 1%

Ficha de Preparação

Medicamento: *Suspensão oral de Trimetropim 1%*

Teor em Substância(s) Activa(s): 100g (ml ou unidades) contém 1g(ml) de Trimetropim

Forma Farmacêutica: Suspensão Data de Preparação: 31/05/17

Número do Lote: 341 Quantidade a Preparar: 60ml

Matérias-Primas	Nº de Lote	Origem	Farmacopeia	Quant. Calculada	Quant. Pesada	Rubrica Operador e Data	Rubrica Operador e Data
Xarope Comum	0066043	Bunarna S.L		30ml x 2	60ml	JR	
Trimetropim	160017-J-1	Acofarell		0,3 g x 2	0,6095g	JR	
Essência de Baunilha	160022-J-2	Acofarell		3 gotas x 2	6 gotas	JR	

Preparação	Rub. Operador
1. Esterilização dos frascos de vidro escuro + tampas + espátula + conta-gotas.	JR
2. Pasagem do Trimetropim em balança analítica.	JR
3. Adição de xarope comum até sensivelmente metade da capacidade do frasco.	JR
4. Adição do Trimetropim.	JR
5. Colocação de <u>6</u> gotas de essência de Baunilha.	JR
6. Perfazer até <u>60</u> ml.	JR

Aparelhagem utilizada:

Balança analítica, espátula, frasco de vidro, conta-gotas

Embalagem

Tipo de Embalagem: Frasco de vidro escuro

Capacidade: 60 ml

Operador: JR

Condições de Conservação:
 Conservar a suspensão a 4°C no frasco bem fechado.

Operador: JF

Prazo de utilização:
 Consumir até 2 meses após a preparação.

Operador: JF

Verificação:

Ensaio	Especificações	Resultado	Rub. Operador
Organolético	Côr Aspecto Cheiro	<u>Conforme</u>	<u>JF</u>

Rubrica do Dir. Técnico	Data
<u>JF</u>	31-05-2017

Anexo 5

Formação Omega Pharma- VITERRA



CERTIFICADO
de formação

O presente documento atesta que o profissional de saúde

Joana Ferreira

recebeu formação da Omega Pharma na área/no produto

Viterra, no dia 21 Jun 2017

com a duração de 2 horas

Vitor Silveira
Vitor Silveira
Medical Sales & Training Manager

 **OMEGA PHARMA** |  Lagoas Park - Edifício 15, 3º Piso
2740-262 Porto Salvo - Portugal |  www.omega-pharma.pt
info@omega-pharma.pt |  T +351 214 167 610
F +351 214 167 619

Anexo 6

Metodologia KAIZEN, retirado de <https://pt.kaizen.com/home.html> em 01/07/17



PARTE II: Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Lista de Abreviaturas

MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
AIM	Autorização de Introdução no Mercado
INFARMED I.P	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P.
RCM	Resumo das Características do Medicamento
FI	Folheto Informativo
e-CTD	Electronic Common Technical Document
CESP	Common European Submission Portal
PAR	Public Assessment Report
NTA	Notice to Applicants
CTD	Common Technical Document
QRD template	Quality Review of Documents template
EEE	Espaço Económico Europeu
AR	Assuntos Regulamentares

I. Introdução

A indústria farmacêutica é, em si, uma das mais complexas organizações, complexidade esta que ao longo do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) fomentou uma enorme vontade de integrar neste mundo.

A atividade farmacêutica é fortemente regulada e é precisamente a partir do ponto de vista regulamentar “através de cartas, régias, normas, regulamentos e publicação de leis e decretos” ^[1] que o Estado determina a sua tutela sob a profissão farmacêutica e a cadeia do medicamento. Temos como exemplo disto, o acto farmacêutico legislado no Decreto-Lei nº288/200.^[2]

Assim, surgiu o interesse de desenvolver uma “inteligência regulamentar”, visto que o setor dos medicamentos e produtos de saúde é mais globalizado que nunca e a par disto o ambiente regulamentar é mais apertado que nunca, exigindo um conjunto especial de competências, que consigam responder a desafios em todas as fases do ciclo de vida do medicamento^[3].

Estrategicamente, não se trata apenas de desenvolver as competências técnicas inerentes ao exercício regulamentar, mas também outras competências que, em qualquer outro exercício profissional, serão sempre uma mais valia, tais como: a visão estratégica quer do ponto de vista comercial, como negocial, como do desenvolvimento do produto; a habilidade de pesquisa e seleção de informação; a leitura/interpretação de forma crítica; a capacidade de trabalho em equipa e em espaço aberto; a organização indissociada da gestão documental; tudo isto em paralelo com a melhoria na vertente da comunicação e competência nas línguas estrangeiras, visto que o departamento de Assuntos Regulamentares interage com uma multiplicidade de atores, desde internos a externos, nacionais a internacionais. ^[4]

Assim, integrar o departamento de Assuntos Regulamentares da Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A. foi uma experiência enriquecedora, tal como expectava, onde orientada pela Dra. Catarina Madanêlo consolidei conhecimentos, mas adquiri muitos outros, que me acompanharão no meu percurso profissional.

O presente relatório visa avaliar este estágio curricular, considerando que a avaliação é o culminar de todo e qualquer processo formativo e ferramenta de consolidação das competências auferidas em contexto prático. Deste modo é imperativo o recurso a uma metodologia estruturada e sistemática, como a Análise SWOT (*Strengths; Weaknesses; Opportunities; Threats*).

2. Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A

A Bluepharma é uma empresa farmacêutica, fundada em 2001, em Coimbra. Surgiu no contexto de uma oportunidade de negócio, respetivamente na compra de uma unidade industrial pertencente à multinacional Bayer, por um grupo de profissionais do ramo farmacêutico. ^[5]

A sua atividade engloba: produção de medicamentos próprios e para terceiros; investigação, desenvolvimento e registo de medicamentos e ainda comercialização de medicamentos genéricos, através da Bluepharma Genéricos – Comércio de Medicamentos, S.A. ^[5]

Esta é uma empresa que se rege estrategicamente por uma visão de investir para inovar: inovar para internacionalizar, apostando nas parcerias e não descurando o foco da qualidade. E assim auferiu um destaque não só nacional, como também nos mercados internacionais mais rigorosos. ^[6]

A Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A contribui, ativa e positivamente, do ponto de vista económico, bem como na melhoria da acessibilidade aos produtos de saúde, para a realidade portuguesa.

2.1 Departamento de Assuntos Regulamentares e Farmacovigilância

A Bluepharma Indústria Farmacêutica apresenta-se dotada de uma equipa de gestão competente, sendo dividida por departamentos. O departamento no qual desenvolvi tarefas denomina-se: Assuntos Regulamentares e Farmacovigilância.

O principal foco dos Assuntos Regulamentares reporta-se à viabilização da colocação de um medicamento no Mercado, bem como a sua manutenção, independentemente do território. Para tal, é necessário que determinada Autoridade Competente conceda uma autorização, a Autorização de Introdução no Mercado (AIM), no caso de territórios EEE. Além disto, preconiza-se ainda que todas as modificações que o medicamento sofra ao longo do seu ciclo de vida sejam notificadas e autorizadas por essa mesma entidade reguladora, sempre que aplicável. ^[7]

De acordo com o estabelecido pelo Procedimento Operativo Padrão interno da Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A, são responsabilidades deste departamento as seguintes atividades:

- Submissão e gestão de pedidos regulamentares às autoridades, sejam estes:
-Pedidos de AIM; ^[8] Alterações aos termos da AIM; Renovações da AIM; Extensões da AIM; Transferências de AIM.

É da sua responsabilidade, na sequência dos pontos anteriores, a elaboração de secções de AIM aplicáveis, o que implica uma conciliação da informação recebida pelo departamento do Desenvolvimento Analítico e Galénico, com aquilo que está predeterminado nas *guidelines*, a par do *know-how* do profissional que tem espírito crítico para decidir sobre que informações são necessárias e quais são adicionais, tendo em vista, o mínimo comprometimento do titular, não descurando as exigências da qualidade farmacêutica. Continuam funções dos AR: a resposta a pedidos de elementos das Autoridades Competentes, bem como a gestão de compromissos assumidos com esta.

Vale sempre lembrar que todas as atividades de suporte à comercialização de medicamentos, como, por exemplo, a farmacovigilância e o serviço científico no âmbito da resposta a pedidos de informação, por parte de doentes e dos profissionais de saúde, bem como as revisões dos textos aprovados de determinado medicamento (Resumo das Características do Medicamento, Folheto Informativo, Rotulagem); pedido de preço e participação, comunicação de início ou fim de comercialização são do domínio deste departamento.

Na prática, de modo a suportar as atividades desenvolvidas pela Bluepharma Indústria S.A é imperativo não descurar o suporte administrativo e regulamentar como o pedido de certificados oficiais, declarações de organismos oficiais e o licenciamento de instalações de fabrico ou distribuição, o que obriga um conhecimento profundo no que concerne à legislação e normas em vigor, para saber: como, quando e o quê se deve solicitar no âmbito de determinada linha de ação.

Além do descrito anteriormente, é tarefa dos assuntos regulamentares a definição da estratégia regulamentar, quer do ponto de vista comercial, negocial ou até mesmo do desenvolvimento do produto, garantindo que todas as exigências regulamentares se cumprem. É ainda importante, a gestão de tempo e recursos e a gestão do impacto que as secções de AIM têm em toda a fábrica, a título de exemplo, na documentação suporte à Produção, como os registos de fabrico. Assim, patenteia-se a importância do conhecimento da legislação aplicável e normas orientadoras que têm impacto na atividade empresarial, o que exige uma grande demanda de recursos, fruto da constante atualização e modernização do setor farmacêutico. (Anexo 7)

3. Análise SWOT

A análise de SWOT é uma ferramenta de gestão, que permite indagar acerca de fatores internos (Pontos Fortes e Pontos Fracos) e externos (Oportunidades e Ameaças) que são preponderantes e influenciam quer o delineamento estratégico, quer a tomada de decisões.^[9]

Inicialmente, esta abordagem foi desenvolvida para as empresas/indústrias, como elemento chave na gestão, permitindo de forma simples e concisa um posicionamento estratégico, auferindo vantagens competitivas e cultivando uma visão de melhoria contínua, no entanto, rapidamente se popularizou nas mais diversas vertentes, sendo muito útil também a nível pessoal/educacional, como uma perspetiva de auto-avaliação, permitindo um melhor proveito dos talentos, corrigindo eventuais fraquezas e não perdendo de vista quer as oportunidades que possam potenciar a carreira/desenvolvimento pessoal, quer aquilo que pode atrapalhar.
[10],[11]

O presente relatório é uma versão da análise SWOT pessoal (**Tabela 3**), servindo o presente como objeto de avaliação do resultado do estágio desenvolvido, sinalizando os aspetos mais relevantes que favoreceram ou dificultaram a aprendizagem. Em simultâneo, efetua-se a distinção entre as dimensões de ordem pessoal e individual (Análise Interna) e as dimensões correlacionadas com a organização, dinâmica funcional do departamento, perfil/características da orientadora, entre outros (Análise Externa).^[12]

Tabela 3 Modelo de Análise Swot

	Favorecedores (da aprendizagem)	Dificultadores (da aprendizagem)
Análise Interna (âmbito pessoal)	Forças (Strenghts) S	Fraquezas (weaknesses) W
Análise Externa (âmbito organizacional)	Oportunidades (opportunities) O	Ameaças (Threats) T

3.1 Análise Interna

A análise interna reporta às dimensões de ordem pessoal e individual, que podem favorecer ou fragilizar determinados eventos, neste caso, o desenvolvimento do estágio.

3.1.1 Pontos Fortes

No âmbito pessoal, os pontos fortes, e, portanto, favorecedores da aprendizagem durante o decorrer do meu estágio curricular no Departamento de Assuntos Regulamentares, são:

- Formação superior, com unidades curriculares que me valeram de suporte na integração neste departamento, tais como: Assuntos Regulamentares, Deontologia e Legislação Farmacêutica, Garantia e Gestão da Qualidade, bem como as Tecnologias Farmacêuticas;
- Enorme interesse e motivação na área de estratégia regulamentar e nos procedimentos de inserção e manutenção de medicamentos no mercado, que agiram como catalisadores de empenho em cada tarefa, tendo sempre como motivação para cada tarefa o conhecimento que iria adquirir;

- Facilidade na língua inglesa, o que é fundamental na leitura da legislação, de normas orientadoras, da consulta das páginas na internet das diferentes agências regulamentares, na produção escrita de documentos, no preenchimento de formulários, entre outras tarefas que demandam a língua estrangeira;
- Capacidade e gosto pelo trabalho em equipa é outra característica pessoal que foi favorecedora no desenvolvimento do estágio, visto que trabalhar em *open-space*, num departamento, exige uma capacidade de comunicação e metodologia de trabalho voltada para o trabalho em equipa;
- Capacidade de pesquisa científica para responder a questões despoletadas no decorrer de tarefas, que precisam de ser respondidas com o maior rigor e qualidade possível;
- Capacidade de gestão e organização documental, visto que a quantidade de documentação com que se lida neste departamento é enorme.

3.1.2 Pontos Fracos

Ainda no âmbito pessoal, alguns fatores dificultadores da aprendizagem e, que portanto, são aspetos a gerir e melhorar são:

- Pouca/nenhuma experiência profissional;
- Lacunas em alguns conhecimentos não abordados ao longo do curso, nomeadamente, no que concerne ao ponto de vista negocial, comercial bem como estratégia e capacidade de projetar e desenvolver negócio através de produtos, como são os medicamentos;
- Dificuldade em segundas línguas estrangeiras como alemão ou outras, visto que nas páginas da internet das diferentes entidades regulamentares, os requisitos nacionais, encontram-se na língua oficial do país, acabando por ser uma tarefa mais demorada, visto a necessidade constante de tradução das informações e legislação aplicável nesse país, para a língua inglesa;
- Pouca experiência em comunicação formal na língua inglesa.

3.2 Análise Externa

A análise externa reporta às dimensões externas correlacionadas com a organização, dinâmica funcional do departamento, perfil/características da orientadora, bem como as tarefas desenvolvidas.

3.2.1 Oportunidades

Quanto às oportunidades e aprendizagens que o departamento de Assuntos Regulamentares me proporcionou, independentes da minha performance e que preconizam, portanto, a análise externa, destacam-se:

- Desenvolvimento da minha capacidade de trabalho e atuação em contexto profissional, nomeadamente, em contexto de uma Organização complexa como é o caso da Indústria Farmacêutica, na área regulamentar, principalmente na vertente da manutenção pós-AIM;
- Oportunidade de melhoria na qualidade da comunicação formal em língua inglesa, principalmente via-email, pelo estabelecimento de comunicação com entidades de diferentes países da Europa, como meio para recolha de requisitos regulamentares nacionais de cada país, bem como da própria língua inglesa devido à leitura de inúmeros documentos, legislação, normas orientadoras entre outros;
- Desenvolvimento de uma visão orientada para o detalhe devido a algumas tarefas realizadas, entre as quais revisão dos textos aprovados pela entidade regulamentar, INFARMED, I.P, como o folheto informativo ou rotulagem, bem como no estabelecimento da história de alterações do produto, que implica atenção e desdobramento de imensa informação contida nas comunicações internas e externas para traçar uma ordem cronológica, nunca descurando do espírito crítico na ordenação da história do produto;
- Aprimorar a capacidade de trabalho em equipa bem como usufruir das vantagens de estar inserida numa equipa, no que concerne à captação de conhecimentos distintos, metodologias de trabalho, bem como presenciar a comunicação intra e extra-departamento;
- Desenvolvimento da capacidade de priorizar as tarefas de acordo com o grau de urgência e importância, estimulada pelo facto de ter realizado, em simultâneo, tarefas distintas;
- Oportunidade de aceder de modo facilitado a redes de informação e plataformas, que fora de uma indústria farmacêutica não teria acesso e como tal, não desenvolveria capacidade de manuseio, tais como a plataforma do INFARMED, I.P para submissão de alterações aos termos da AIM e ainda renovações (SMUH-ALTER), o portal europeu de submissão (CESP), ou ainda uma ferramenta de gestão do dossier comum técnico de forma eletrónica, eCTD; (ver Anexo 9 e Anexo 10)
- Oportunidade de contactar com exigências regulamentares de outros países (ex: Renovações de Registo por Reconhecimento em Moçambique), desenvolver capacidade de estratégia, nomeadamente, a nível das formas de submissão, os tempos de submissão, entre outros, visando a segurança do doente, como primeira preocupação, mas não esquecendo a minimização de custos para a Organização.

3.2.2 Ameaças

Continuando a análise a nível externo, as ameaças despoletadas pela realização do estágio curricular, portanto, fatores que não estão diretamente no meu controlo e que podem, futuramente, impactar de forma negativa, são:

- Aquisição de vícios de trabalho, nomeadamente, no concerne na forma de desenvolver as tarefas, ritmo de trabalho, maneira de contatar os colaboradores, gestão documental e do fluxo de informação;
- Moldar a minha visão da indústria farmacêutica segundo o que aprendi na Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A e o contexto desta;
- Contatei, maioritariamente, com bases legais de genéricos, híbridos e de uso bem estabelecido, permanecendo com lacunas no que se relaciona a desenvolvimento de projetos e inovadores, o que pode limitar a minha atuação a nível regulamentar.

Assim sendo, de forma geral, a construção da minha análise SWOT pessoal após a realização deste estágio repercute-se na seguinte **Tabela 4**:

Tabela 4: Análise SWOT pessoal decorrente do estágio curricular em Assuntos Regulamentares, em Indústria Farmacêutica (Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A)

S	W
<ul style="list-style-type: none">- Formação superior;- Motivação na área;- Língua inglesa;- Pesquisa Científica;- Trabalho em equipa;-Gestão documental.	<ul style="list-style-type: none">-Nenhuma experiência profissional;- Dificuldade em segundas línguas (excetuando o inglês e espanhol);-Pouca experiência na escrita e comunicação oral formais em língua inglesa.- Lacunas na área negocial, comercial e de desenvolvimento estratégico;
O	T
<ul style="list-style-type: none">- Início da atuação em contexto profissional em ambiente da indústria;- Melhoria da língua inglesa e prática em comunicações no ambiente de trabalho (via e-mail, principalmente);- Construção de uma ótica orientada para o detalhe;- Melhoria da capacidade de trabalho em equipa e em ambiente aberto;- Desenvolvimento da aptidão de priorização de tarefas;- Acesso a plataformas/ferramentas como SMUH-ALTER; CESP; EDQM; eCTD.	<ul style="list-style-type: none">- Aquisição de vícios de trabalho;- Molde da visão da Indústria segundo o que retirei da Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A.;- Contato, maioritariamente, com bases legais de processos resumidos, como genéricos, híbridos, uso bem estabelecido.

4. Casos práticos

I. Bridging de Textos

Na sequência da submissão da AIM para o medicamento X há a necessidade de construção do CTD (ver Anexo 8), incluindo, textos como o FI e RCM, que segundo o NTA, são componente do módulo I, respetivamente ao sub-módulo I.3. Uma das tarefas que desenvolvi foi a escrita destes textos segundo o template QRD mais atualizado. Como é legislado, os FI são alvo de um teste de legibilidade, maneira de garantir a compreensão do utente e, portanto, a sua segurança. No entanto, é aplicável a possibilidade de se efetuar um *bridging*, que se baseia na demonstração da legibilidade, suportando-se na legibilidade já comprovada de um FI de outro medicamento equivalente, e refletida no relatório público de avaliação (PAR).^[13]

Desta tarefa agreguei conhecimento regulamentar, nomeadamente, no que concerne aos ensaios de legibilidade e a possibilidade de poupar tempo e recursos por comparação do texto com o FI de um medicamento com PAR, bem como desenvolvi uma postura crítica na produção escrita, na interpretação dos pontos do template QRD. Além disto, tarefa motivou uma atenção ao detalhe para que toda a informação transcrita refletisse o demonstrado no restante dossier de AIM, sob pena de indeferimento ou pedidos de elementos por parte da autoridade regulamentar, pressão sugestiva do contexto profissional real. A par disto, o desenvolvimento do relatório para comparação do conteúdo, bem como o layout e disposição estética (nem só o conteúdo é alvo de avaliação, a própria legibilidade no que concerne ao tipo e tamanho de letra, bem como formatação, é também alvo de avaliação.) do FI entre o produto X que pretendemos submeter e o Y (que tem PAR), em língua inglesa, foi chave para aprimorar a minha competência escrita em inglês.

II. Resposta a pedido de elementos por parte do INFARMED, I,P.

Na sequência da avaliação do processo de submissão da AIM pela entidade regulamentar houve um pedido de elementos pelo avaliador toxicológico, a qual foi minha tarefa responder. Tratava-se da atualização da secção 5.3 do RCM, em que exigiam dados de toxicidade crónica, reprodutiva e aguda.

Desta tarefa resultou a necessidade de efetuar um delineamento estratégico para responder a uma questão real, o que já por si, culmina na construção de uma desenvoltura necessária no contexto profissional. Para proceder com a resposta ao pedido de elementos foi essencial um estudo do sub-módulo 2.4, do CTD, o relatório não clínico, pelo que adquiri conhecimento dos fundamentos/estudos não clínicos que acompanham uma molécula ativa, relembrando, uma vez mais, que, em lugar de honra, deve permanecer o doente. Além disto,

quanto à resposta, propriamente dita, tive oportunidade de trabalhar com plataformas como o eCTD^[14], uma ferramenta de organização e gestão do CTD, de forma eletrónica, onde podemos ter acesso a todos os módulos, seções e documentos que vigoram; CESP^[15] que é uma plataforma europeia de submissão às Autoridades Competentes, e, que, portanto, permite a troca de informação de forma segura e simples entre titulares e agências reguladoras.

5. Considerações finais

Como referido anteriormente, a etapa final de qualquer processo formativo deve ser a avaliação, de forma a possibilitar uma consciencialização mais próxima da realidade, daquilo que retemos e nos será proveitoso, futuramente.

Da realização do meu estágio curricular no Departamento de Assuntos Regulamentares, na Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A, trago não só a postura em contexto profissional, como outras capacidades que potenciarão as minhas competências/conhecimentos, em qualquer que seja o campo de atuação profissional, que eventualmente, me aguarde.

Assim, a avaliação global prevê-se extremamente positiva. Foram três meses onde pude atuar de forma ativa no mundo profissional, onde tive oportunidade de analisar, intervir em situações concretas, desenvolver e aprimorar características transversais como o espírito crítico, a capacidade de trabalho em equipa e em ambiente aberto, a atenção ao detalhe, a organização e gestão documental, bem como a língua estrangeira, entre outras. O desenvolver deste estágio foi receita para o entendimento do mundo profissional complexo, visto a indústria farmacêutica, ser uma organização obrigada a corresponder a exigências legais, regulamentares, negociais e comerciais apertadas, além da perceção que a motivação e o espírito inovador são elementos-chave para singrar nas tarefas a que nos propomos.

O encadeamento de várias matérias abordadas ao longo do curso com a realidade do dia-a-dia foi extremamente gratificante, potenciado, pelo facto, de trabalhar com profissionais altamente qualificados e com vastos conhecimentos, que sempre se dispuseram a auxiliar-me.

Posso concluir que, seguramente, as expectativas que havia formado previamente ao estágio foram ultrapassadas, clarificando que os Assunto Regulamentares são uma área de atuação extremamente importante, onde o Farmacêutico se faz um profissional qualificado, sendo mais uma vertente que patenteia a competência deste profissional, onde primitivamente está segurança do doente e de quem toma o medicamento, visto que todos os eventos regulamentares são focados na manutenção da relação benefício-risco que assegura essa segurança. Apesar disto, e porque é possível fazer mais com menos, não se deve descurar a

estratégia de submissão desses eventos regulamentares, visando também o melhor para a organização.

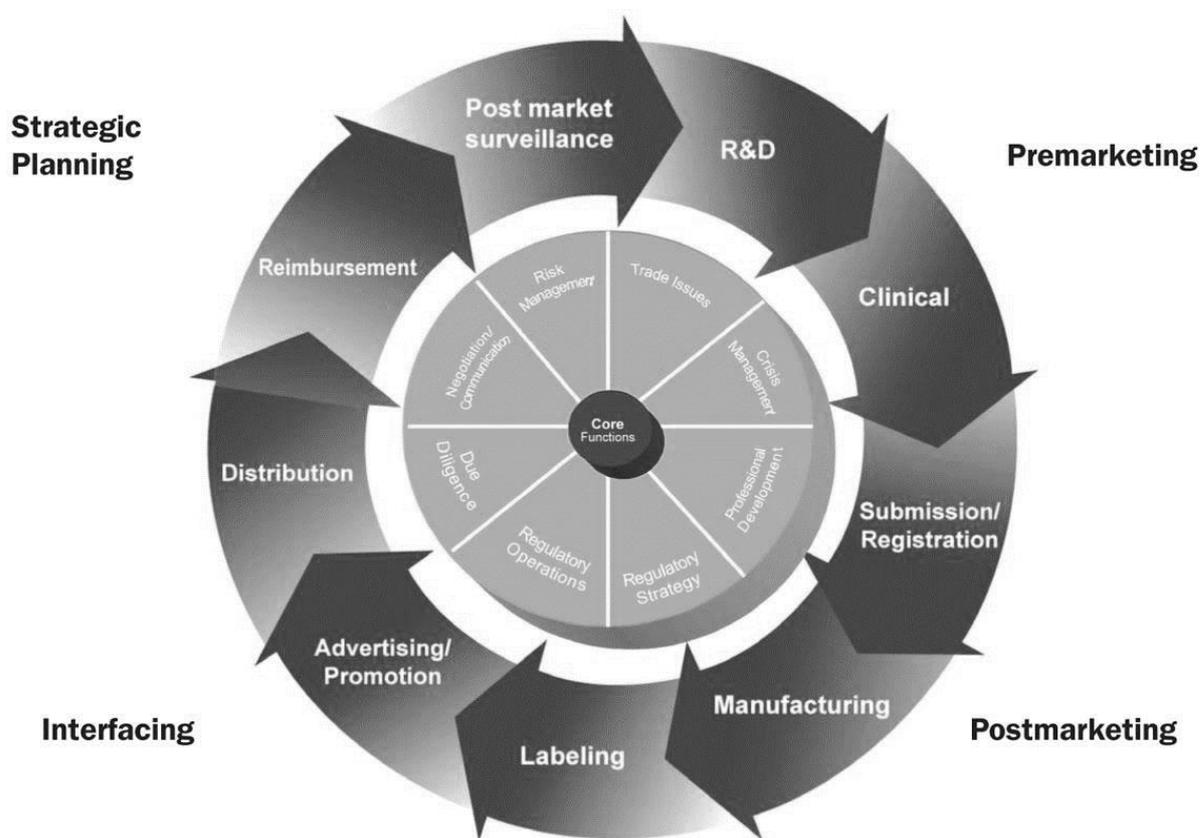
Referências Bibliográficas

1. Áreas de atividade: Assuntos Regulamentares, disponível em: http://www.ordemfarmaceuticos.pt/scid//ofWebStd_1/defaultCategoryViewOne.asp?categoryId=1906, última consulta em: 28/01/2017;
2. Decreto-Lei n.º 288/2001 de 10 de Novembro disponível em: http://www.ordemfarmaceuticos.pt/xfiles/scContentDeployer_pt/docs/doc2848.pdf, última consulta: 28/01/2017;
3. “Why Regulatory Intelligence Is More Important Than Ever”, artigo de revista 1 de Abril de 2013, disponível em : <https://www.pharmaceuticalonline.com/doc/why-regulatory-intelligence-is-more-important-than-ever-0001>, última consulta em:28/01/2017
4. “Role and Strategic importance of Regulatory Affairs”, apresentação realizada por Eva Kopečna, Head of RA – Global OTC, Teva Europe, disponível em: https://embed.topra.org/sites/default/files/lecture_1_-_kopcna_e.pdf, última consulta em: 28/01/2017
5. Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A, “Quem somos”, disponível em: <https://www.bluepharma.pt/about.php>, última consulta em: 28/01/2017
6. Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A, “Missão, Visão, Valores”, disponível em: <https://www.bluepharma.pt/mission-vision-values.php>, última consulta em: 28/01/2017
7. Medicamentos de Uso Humano- Autorização de Introdução no Mercado, disponível em: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/autorizacao-de-introducao-no-mercado> , última consulta em: 28/01/2017;
8. EudraLex - Volume 2 - Pharmaceutical legislation on notice to applicants and regulatory guidelines for medicinal products for human use, disponível em: http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-2_en, última consulta em: 28/01/2017;
9. “SWOT Analysis - Do It Properly!” disponível em: <https://www.strategicmanagementinsight.com/tools/swot-analysis-how-to-do-it.html>, última consulta em: 28/01/2017;
10. “Section 14. SWOT Analysis: Strengths, Weaknesses, Opportunities, and Threats”, disponível em <http://ctb.ku.edu/en/table-of-contents/assessment/assessing-community-needs-and-resources/swot-analysis/main>, última consulta em 28/01/2017;

11. “SWOT Analysis: Discover New Opportunities, Manage and Eliminate Threats”, disponível em https://www.mindtools.com/pages/article/newTMC_05.htm, última consulta em: 28/01/2017
12. Pereira, Rui Pedro Gomes; Rito, Maria (2013), A análise SWOT como estratégia de (auto) avaliação : uma partilha de experiências em contextos de prática clínica supervisionada. Última consulta em: 28/01/2017
13. Infarmed- Perguntas Frequentes- Legibilidade do Folheto Informativo, disponível em: http://www.infarmed.pt/web/infarmed/perguntas-frequentes-area-transversal/legibilidade_folheto_informativo, última consulta: 13/03/2017
14. eCTD, disponível em <http://esubmission.ema.europa.eu/ectd/>, última consulta em: 14/03/17
15. CESP disponível em <http://cesportal.hma.eu/>, última consulta em: 14/03/17

Anexos

RA Profession: Integral to the Healthcare Product Lifecycle

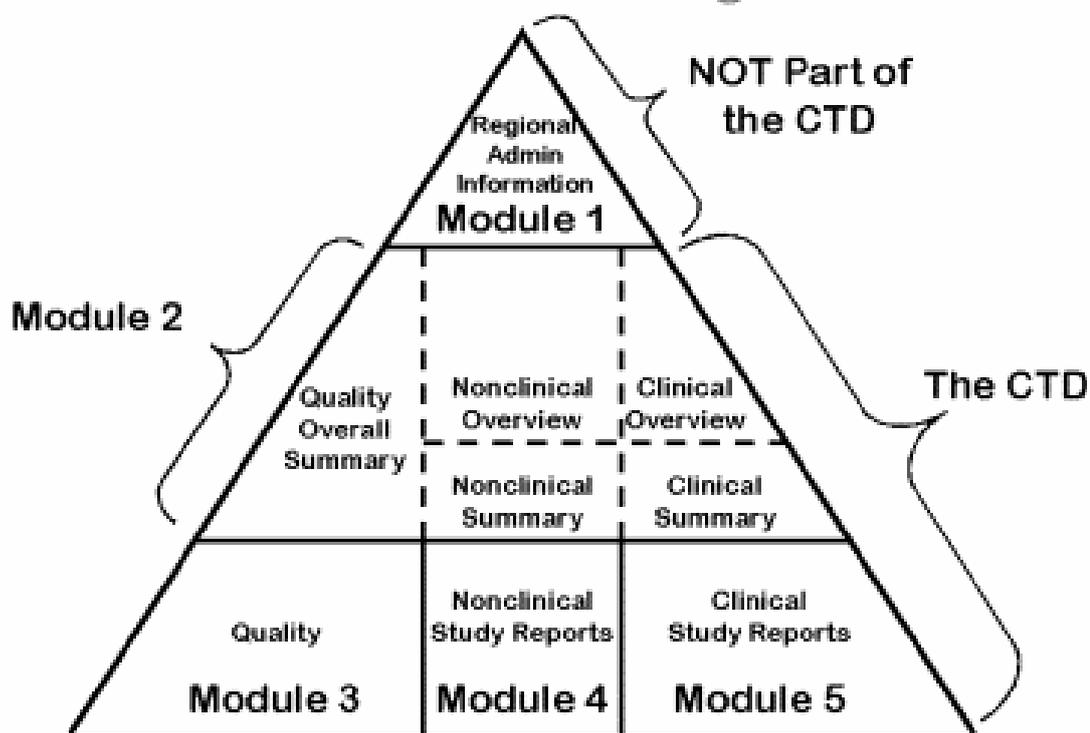


© 2007 Regulatory Affairs Professionals Society

Anexo 7

Os assuntos regulamentares têm como objeto de trabalho o ciclo de vida do medicamento ou produto de saúde, em todas as suas fases. Desde a fase de investigação e desenvolvimento até ao serviço pós-mercado, que inclui a manutenção dos três pilares do medicamento: a eficácia, a segurança e a qualidade, tendo várias atividades para a consumação disto, entre elas: as alterações aos termos da AIM, bem como a farmacovigilância. A imagem permite depreender que se exige muito mais do que a viabilização do medicamento no mercado, através da obtenção de uma AIM, há toda uma estratégia pré e pós mercado, bem como a interação com uma multiplicidade de atores e interfaces, sejam dentro da própria indústria, com parceiros ou com as autoridades competentes. Vale ainda lembrar que toda a estratégia regulamentar, seja do ponto de vista comercial, negocial, ou até mesmo do desenvolvimento do produto têm sempre um input AR.

The CTD Triangle

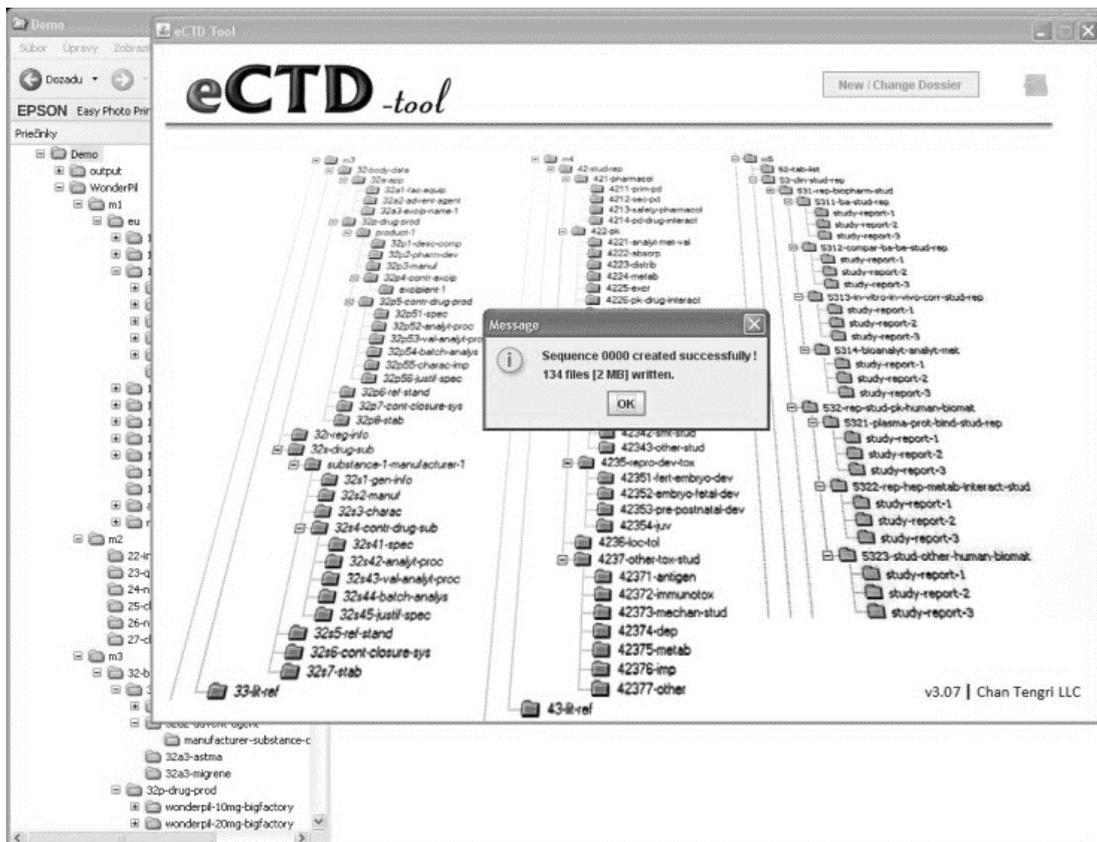


Anexo 8

O Triângulo do CTD.

O Common Technical Document é organizado em cinco módulos. O módulo 1 é específico de cada região, pelo que não se constitui especificamente do CTD, enquanto que os módulos 2, 3, 4 e 5 pretendem ser comuns para todas as regiões.

O acordo para reunir toda a informação que sustente a eficácia, segurança e qualidade num único documento e formato comum veio revolucionar os processos regulatórios, levando a uma submissão harmonizada que permitiu a implementação de boas práticas de revisão. Por outro lado, este facto aboliu a necessidade da indústria em reformatar a sua documentação de cada vez que pretendia submeter a diferentes autoridades competentes ICH.



Anexo 9

eCTD-tool

É uma forma de gestão eletrónica do CTD, ou seja, do dossier do medicamento, onde consta a documentação atualizada e que permite efetuar um histórico completo de todas as submissões. Esta ferramenta permite submeter documentação quer nos EUA, como na Europa.

Este formato eletrónico permite uma leitura muito mais rápida e agilizada, poupa recursos no que concerne às múltiplas impressões outrora necessárias, bem como permite submissões instantâneas obviando o tempo de envio dos documentos, bem como a possibilidade de extravio, a par disto há uma minimização do espaço necessário de arquivo e a possibilidade de reutilização da documentação. Para as próprias autoridades competentes a revisão e avaliação torna-se facilitada, o que reduz o tempo de avaliação das submissões contribuindo para a constante atualização do ciclo de vida do medicamento, garantindo sempre, em lugar de honra, a segurança do doente.

cespportal.hma.eu/Account/Login?ReturnUrl=%2f

HMA Common European Submission Portal

Home Announcements FAQs General Information Contacts Terms & Conditions Register

Welcome to the Common European Submission Portal

This system provides a simple and secure mechanism for exchange of information between applicants and regulatory agencies.

The purpose of the system is to:

- Provide a secure method of communicating with the Regulatory Agencies via one platform
- Allow submission of an application once to reach all required Agencies
- Reduce the burden for both Industry and Regulators of submitting/handling applications on CD-ROM and DVD

Login

Username

Password [Forgot password?](#)

Log in **Register**

Latest Updates

Contact GR(EOF)	29-JUN-2016
Contact SK(SUKL)	21-JUN-2016
Contact LT(NM/RVI)	03-JAN-2017
Contact UK(MHRA)	22-FEB-2017
Contact	

Anexo I0

Portal CESP

O portal de submissão CESP é uma plataforma que permite o envio e troca de documentação entre titulares e agências reguladoras. Os objetivos deste sistema são: aumentar a segurança destas comunicações e permitir que sejam efetuadas num único local; permitir o envio em simultâneo para todas as autoridades em questão; bem como reduzir a carga de submissões via CD-ROM ou DVD.

PARTE III: CRISPR/Cas9 na produção de modelos de doenças do cérebro

Lista de Abreviaturas

DSB	<i>Double Strand Break (Quebra da dupla cadeia de DNA)</i>
ZFN	<i>Zinc Finger Nuclease (Nuclease Dedo de Zinco)</i>
TALEN	<i>Transcription activator-like effector Nuclease</i>
CRISPR	<i>Clustered Regulated Interspaced Palindromic Repeats</i>
Cas 9	<i>Caspase 9</i>
NHEJ	<i>Non Homolog End Joining (União das extremidades não homóloga)</i>
HDR	<i>Homology Directed Repair</i>
HR	<i>Homologous Recombination (Recombinação Homóloga)</i>
InDels	<i>Insertions and Deletions</i>
PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i>
pre-crRNA	<i>Pre- CRISPR RNA</i>
crRNA	<i>CRISPR RNA</i>
tracrRNA	<i>Transactivating CRISPR RNA</i>
NGG	<i>N-qualquer nucleótido; G- Guanina</i>
sgRNA	<i>Single guide RNA</i>
ESC	<i>Embryonic stem cells (Células estaminais embrionárias)</i>
AAV	<i>Adeno-associated virus (Vírus adenoassociados)</i>
iPSC	<i>Induced pluripotent stem cell (Células estaminais pluripotentes induzidas)</i>
SNC	<i>Sistema Nervoso Central</i>

Resumo

Compreender e tratar o cérebro permanece um dos maiores desafios da ciência, pelo que novas ferramentas que possam contribuir para vencer estes desafios constituem uma importante esperança.

O advento do sistema CRISPR (*Clustered Regulated Interspaced Palindromic Repeats*) teve um enorme impacto nas ciências da vida e em particular nas neurociências, visto que inúmeras patologias neurológicas resultam de defeitos genéticos. Esta ferramenta de edição genética permite quer a correção, quer a reprodução destes defeitos em modelos de doença do cérebro de forma mais expedita e precisa que as técnicas anteriormente disponíveis. Nesta monografia focamo-nos na utilização desta tecnologia para a produção de modelos de doença.

O sistema CRISPR/Cas 9 é composto por uma endonuclease (Cas9) guiada por meio de um RNA de cadeia dupla, CRISPR RNA (crRNA) e um CRISPR RNA transactivador (tracrRNA), ou alternativamente um único RNA guia (sgRNA) que complexam com a enzima. Este complexo é direcionado ao fragmento de DNA-alvo e, após o emparelhamento, a Cas9 origina a clivagem da cadeia dupla de DNA, no local-alvo. É de notar, que é requisito para a atividade de nuclease da Cas 9 a existência do domínio PAM, um conjunto de três nucleótidos altamente conservados, imediatamente a jusante do local de corte. As quebras duplas na cadeia de DNA (DSBs) podem ser reparadas por dois mecanismos: a união das extremidades não-homóloga (NHEJ) ou por Recombinação Homóloga (HDR). Através destes mecanismos de reparação podemos induzir disrupção de genes (*knock-out*) ou inserção específica de segmentos (*knock-in*). Assim, empregando o sistema CRISPR/Cas 9 é possível a geração, numa única etapa, de modelos celulares e animais, com as mutações que pretendemos estudar.

Resumidamente, o processo de investigação envolve três passos:

1. Estudos genéticos identificam a mutação genética, relacionada com a doença neurológica;
2. A CRISPR é usada quer para disrupção ou inserção de mutações específicas, nos genes identificados;
3. Modelos (animais, celulares) da doença são estudados com vista a clarificar processos patológicos, bem como usados na identificação de novos fármacos, que permitam reverter ou bloquear a progressão da doença.

No entanto, esta ferramenta, tem também limitações que importa conhecer para uma correta utilização e aperfeiçoamento deste sistema na produção de modelos de doenças do cérebro. Entre estas limitações contam-se os efeitos fora do alvo; meios de vectorização deficientes; ineficiência dos mecanismos de reparação de DNA por homologia no cérebro, mosaicismos.

Em resumo, os sistemas de edição genética baseados na CRISPR-Cas9 são uma enorme esperança na produção de novos modelos de doença, mais perfeitos e relevantes, mas ainda com complexidades e limitações que importa ultrapassar de forma a tirar o máximo partido destes e a alcançar os esperados avanços no conhecimento e tratamento das doenças do cérebro.

Palavras-chave: doenças neurológicas, edição genética, CRISPR/Cas9, DSBs, NHEJ, HDR, modelos de doença.

Abstract

Understanding and treating the brain remain one of the biggest challenges to science, so tools that can aid to overcome these challenges are highly promising.

The advent of the CRISPR system has had a tremendous impact on life sciences and particularly in neuroscience, since numerous neurological disorders stem from genetic defects. Thus, this genetic editing tool is important for both the removal, as well as the reproduction of these defects, for the generation of brain disease models.

CRISPR / Cas 9 is a system consisting of an endonuclease (Cas9) guided by a double-RNA, CRISPR RNA (CRRNA) and trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA), or alternatively, a single guide RNA (sgRNA) which complexes with the enzyme. This complex targets a DNA sequence and, after annealing, Cas9 causes double-stranded breaks, at the target site. It should be noted that the existence of a PAM domain is required for the activity of Cas9, immediately following the target sequence. Double stranded breaks (DSBs) can be repaired by two mechanisms: non-homologous end-joining (NHEJ) or Homologous Recombination (HR). Through these repair mechanisms we can induce gene disruption (knock-out) or sequence-specific insertion (knock-in). Thus, using the CRISPR / Cas 9 system, it is possible to generate, in a single step, cellular and animal models, with the mutations we intend to study.

Briefly, the research process involves three-steps:

1. Genetic studies identify the genetic mutation, related to the neurological disease;
2. CRISPR is used either for disruption or insertion of specific mutations in the genes identified;
3. Animal models of the disease are studied in order to clarify pathological processes as well as used in the testing of new drugs as a way of evaluating disease regression.

However, not only advantages accompany this tool, it is also necessary to discuss its limitations (off-target, means of effective vectorization, DNA repair mechanisms inefficient, mosaicism), to correctly discuss the future of this system in the production of models of brain diseases.

In summary, gene-editing systems based in CRISPR-Cas9 are a huge hope in the production of new models of disease, perfected and more relevant, but still with complexities and limitations that are important to overcome in order to take maximum profit and reach the expected advances in the knowledge and treatment of brain disorders.

Keywords: neurological disorders, genetic editing, CRISPR/Cas9, DSBs, NHEJ, HDR, models disease.

Introdução

Desde a descoberta da dupla hélice de DNA, os investigadores têm sonhado com a possibilidade de manipular o genoma em locais específicos e assim estudar a função dos genes, desenvolver novos modelos de doença, novos fármacos e estratégias terapêuticas para doenças genéticas (Doudna e Charpentier, 2014; Hsu, Lander e Zhang, 2014).

A engenharia genética tem sofrido avanços assinaláveis que estão a revolucionar a biologia, permitindo estudar o DNA no contexto do genoma, bem como editá-lo diretamente, em praticamente qualquer organismo (Hsu, Lander e Zhang, 2014). O estudo dos mecanismos endógenos de reparação de DNA demonstrou que os métodos de reparação com recurso a quebra dupla na cadeia de DNA (DSBs) são uma via para modificação específica do genoma, que pode incluir quer a disrupção de genes, quer a inserção de mutações específicas (Choulika *et al.*, 1995). Partindo desta ideia, é fácil compreender que nucleases com capacidade de clivar especificamente um local preciso do genoma são uma ferramenta importante, visto que desencadeiam dupla quebra da cadeia de DNA, e, portanto, são um caminho para a modificação genética (Doudna e Charpentier, 2014).

A existência de mutações diretamente relacionadas com doenças, como doenças neurológicas, é motivação para a aplicação das ferramentas de edição genéticas no domínio das neurociências. Desta forma, nucleases em dedos de zinco (ZFNs); *transcription activator-like effector* (TALENs) e o sistema CRISPR/Cas9 têm possibilitado a produção de modelos de doença, celulares ou animais, bem como a manipulação facilitada de modelos animais não tradicionais, ou, ainda, a sua utilização como estratégia terapêutica (Heidenreich e Zhang, 2015).

O desenvolvimento de nucleases guiadas por RNA, derivadas do mecanismo de imunidade adaptativa das bactérias (*Bacteria* e *Archaea*), revolucionou a capacidade de manipulação de células de mamíferos, devido à facilidade de direcionamento a qualquer gene, uma vez que, depende, apenas, da alteração de aproximadamente 20 nucleótidos do RNA guia. Assim, é fácil de perceber a preferência dada ao sistema CRISPR/Cas9 quando esta ferramenta

é comparada com outras ferramentas de edição génica, cuja interação se dá com proteínas, tais como as ZFNs e TALENs e que comportam dificuldades acrescidas no respectivo design, síntese e validação proteica (Doudna e Charpentier, 2014).

Nesta monografia será abordada a vertente de produção de modelos de doenças neurológicas, uma das inúmeras aplicações do Sistema CRISPR. A sua importância é clara tendo em conta que, a maioria das doenças neurológicas tem uma patogénese desconhecida e o *screening* de fármacos para tratar estas doenças, até ao presente, tem sido dificultado pela inexistência de modelos adequados, como por exemplo, modelos animais de maior porte que reproduzam mais fielmente a doença humana, quando comparados com roedores (Tu *et al.*, 2015). Serão ainda referidas as limitações que acompanham esta tecnologia como, tais como os efeitos fora do alvo, mosaicismo e ineficiência dos mecanismos de reparação de DNA.

2. Nucleases programáveis como ferramentas de edição precisa do genoma

2.1. Quebra dupla das duas cadeias de DNA (DSBs) como estratégia para a edição genómica precisa.

Um requisito fundamental para a edição genómica precisa é o estabelecimento de dupla quebra das cadeias de DNA (DSBs), no *locus* de interesse. As DSBs induzem os mecanismos endógenos de reparação que, dependendo do estado do ciclo celular, bem como da presença ou não de um template dador com homologia às regiões onde o corte ocorre, podem ser: União das extremidades não homóloga (NHEJ) e reparação direta por homologia (HDR), onde se inclui a recombinação homóloga (HR) (Figura 1). Os mecanismos anteriores permitem a manipulação precisa do genoma, podendo resultar em disrupção de genes ou introdução de uma mutação específica, dependendo, intimamente, de qual dos mecanismos de reparação é estimulado (Choulika *et al.*, 1995; Guha, Wai e Hausner, 2017; Hsu, Lander e Zhang, 2014; Sander e Joung, 2014). É fácil concluir da importância das nucleases indutoras de quebras no DNA que, simultaneamente, sejam dotadas de uma especificidade-alvo (capacidade de direcionamento a um fragmento de DNA alvo). Ou seja, esta tecnologia assenta em dois domínios, um domínio programável para o reconhecimento de sequências específicas e um domínio catalítico (Brookhouser *et al.*, 2017).

2.1.1 NHEJ

A junção não homóloga de extremidades (NHEJ) é a via de reparação predominante, no entanto, é também a mais propensa a erros, podendo levar à perda de informação, na região da quebra, o que aumenta a instabilidade genómica (Fellmann *et al.*, 2017). Esta via de reparação está, na maioria das vezes, associada a mudanças no quadro de leitura, as chamadas

mutações *frameshift*, que se devem à introdução de inserções/deleções (InDels) aleatoriamente. Pelo disposto anterior, usualmente, esta via resulta na disrupção de genes (*knock-out*) e/ou introdução precoce de um codão de terminação, na região codificante, o que culmina na formação de proteínas truncadas (Brookhouser *et al.*, 2017; D'Agostino e D'Aniello, 2017; Guha, Wai e Hausner, 2017; Sander e Joung, 2014).

2.1.2 Reparação homóloga - HDR

A reparação homóloga (HDR) é a uma via de reparação de DSBs pouco frequente e dependente do estadió do ciclo celular, sendo comumente associada à fase S e G2 (Fellmann *et al.*, 2017; Heidenreich e Zhang, 2015; Xiong *et al.*, 2016). Este mecanismo é o que apresenta maior fidelidade de reparação, visto tratar-se da introdução de um fragmento de DNA exógeno que mantém a homologia, e, portanto, a estabilidade genómica (D'Agostino e D'Aniello, 2017). Em conjunto com a utilização de nucleases programáveis, pode haver uma co-entrega de uma sequência molde exógena, que atuará como dador homólogo, estimulando esta via de reparação (Dow, 2015). Pelo disposto anterior depreende-se que a HDR está, na maioria das vezes, associada a introduções específicas de mutações, no local-alvo, sendo ideal para situações de *knock-in* de genes/formação de transgenes ou ainda mutações específicas/SNP (Hsu, Lander e Zhang, 2014). Apesar, das potenciais aplicações que esta via poderá ter na edição genómica, a baixa taxa de integração, e, portanto, a sua baixa frequência, é uma limitação à transposição de escala (Hsu, Lander e Zhang, 2014).

É de notar que, a preferência celular por um ou outro mecanismo de reparação pode ser aumentada (D'Agostino e D'Aniello, 2017). Diversos grupos de investigadores descreveram pequenas moléculas inibitórias que conseguem desviar tal preferência quer para NHEJ, que para a HDR, possibilitando assim um outro nível de manipulação genética (Chu *et al.*, 2015; Dow, 2015).

Os mecanismos de reparação descritos anteriormente são ubíquos em todas as células e assim sendo, o desafio reside na construção de nucleases artificiais que reconheçam especificamente um local-alvo no genoma, fazendo jus à sua denominação, nucleases programáveis, e que induzam DSBs (Ding *et al.*, 2016).

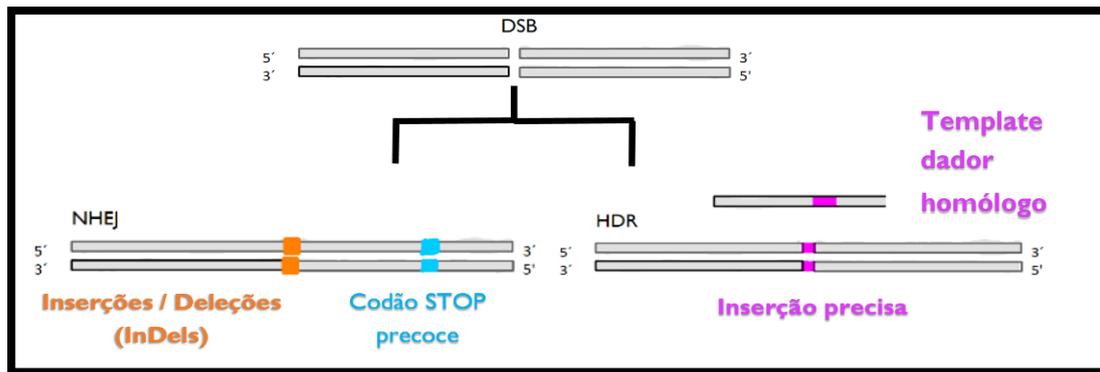


Figura 1: As duplas quebras na cadeia de DNA (DSBs) podem ser reparadas de duas formas. Na ausência de um molde *template* e, na maioria das vezes, ocorre uma reparação direta com a união das extremidades não homólogas (NHEJ), e com isto, há introdução de curtas inserções/deleções no local da clivagem (InDels), pelo que, frequentemente, gera mutações *frameshift*, que podem resultar em códons de terminação precoce, degradação do transcrito e perda da proteína. Pelo contrário, quando se encontra presente um *template* (ex: um oligonucleotídeo de cadeia simples) homólogo à região danificada, a reparação por recombinação homóloga (HR), um mecanismo de reparação por homologia-direta (HDR), acontece. Daqui resulta a introdução de uma sequência específica no genoma.

2.2 Meganucleases; ZFNs; TALENs

Com o propósito de introduzir quebras duplas da cadeia de DNA (DSBs) são comumente referidas as meganucleases (Smith *et al.*, 2006), nucleases dedos de zinco (*zinc-finger* - ZFN) (Gaj, Gersbach e Barbas, 2013) e nucleases *transcription activator-like effectors* (TALENs) (Nemudryi *et al.*, 2014) que reconhecem sequências de DNA específicas por interação proteica.

As Meganucleases são versões sintéticas derivadas de enzimas de restrição que ocorrem naturalmente em micro-organismos e que reconhecem sequências de DNA extensas (Hsu, Lander e Zhang, 2014; Sander e Joung, 2014). Por sua vez, as ZFNs e as TALENs são proteínas de fusão compostas por domínios de ligação ao DNA e um domínio nuclease, denominado FokI, derivado de uma endonuclease de restrição, que reconhecem 3 e 1 nucleótidos, respetivamente (Gaj, Gersbach e Barbas, 2013; Guha, Wai e Hausner, 2017; Sander e Joung, 2014).

As Meganucleases não foram amplamente adotadas, dadas as dificuldades de construção e introdução de especificidade, visto que as diferentes funções: reconhecimento da sequência de DNA e clivagem, estão interrelacionadas no mesmo domínio (Hsu, Lander e Zhang, 2014; Sander e Joung, 2014). Em contrapartida, as ZFNs e as TALENs têm dois domínios separados, de reconhecimento e clivagem (FokI), o que facilita a alteração da especificidade de ligação a uma sequência-alvo. No entanto, cada uma destas plataformas exhibe limitações particulares, tais como a especificidade dependente da conformação adotada entre os domínios ZFs até aos métodos de clonagem não-padrão exigidos para a clonagem de

moléculas de DNA que codificam para um elevado número de repetições TALEs (Sander e Joung, 2014).

É de notar que dificuldades no design de proteínas, na sua síntese e validação constituem uma barreira à adoção destas nucleases como ferramenta de rotina, para a edição genómica, pelo que não permitem uma transposição de escala simples (Doudna e Charpentier, 2014).

2.3 CRISPR-Cas

Ao contrário das ferramentas descritas anteriormente, o sistema CRISPR não se deve à interação DNA-proteína, ultrapassando, portanto, os desafios associados à engenharia de domínios de proteínas que reconheçam locais específicos no genoma. A nuclease do sistema CRISPR é guiada por uma cadeia de RNA, que reconhece o DNA-alvo por complementaridade de bases de Watson-Crick (Doudna e Charpentier, 2014; Hsu, Lander e Zhang, 2014).

Daqui, depreende-se a preferência por esta ferramenta e a sua ampla utilização, devido à facilidade de conceção, bastando a construção de RNAs guia para, teoricamente, se promover uma hibridização e clivagem de qualquer gene-alvo. Além da facilidade relatada em alterar a especificidade, também a capacidade de *multiplexing*, ou seja, de manipular, simultaneamente, múltiplos genes através de múltiplos RNAs-guia é uma vantagem deste sistema. Isto porque introduzir mutações em múltiplos genes, simultaneamente, permite estudar a epistasia genética, bem como criar modelos de doença mais complexos sem estratégias de cruzamento longas e complicadas (Lee *et al.*, 2016; Sander e Joung, 2014). Além da sua eficiência, há relatos de menor toxicidade quando comparada com a utilização de ZFNs e TALENs (Doetschman e Georgieva, 2017) (**Anexo II**).

3. Origem e biologia do Sistema CRISPR-Cas

O sistema CRISPR, ou seja, repetições palindrómicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas, deriva de um sistema de imunidade adaptativa, presente em muitas bactérias e na maioria dos *archaea* (Fellmann *et al.*, 2017).

Há evidências que o locus CRISPR se encontra associado a genes que codificam para proteínas com domínios nuclease e helicase (2) (Bolotin *et al.*, 2005; Haft *et al.*, 2005). Sabendo que as sequências espaçadoras, se reportam a fragmentos de DNA de origem viral ou plasmídica (Grobarczyk *et al.*, 2015), e que após transcrição do locus CRISPR, o crRNA dirige as proteínas Cas ao local do genoma invasor, com o qual exhibe complementaridade e procedem à clivagem do genoma estranho (Doudna e Charpentier, 2014); entende-se que, efetivamente, se trata de um sistema de defesa, que faz uso de RNAs antisense, como sinais de memória de infeções passadas, quando a bactéria sobrevive (Makarova *et al.*, 2006).

Até agora, a classificação dos sistemas CRISPR divide-se em duas grandes classes e em seis tipos, de acordo com ferramentas bioinformáticas. A classe I, que engloba os tipos I, III e IV, requer um elevado número de proteínas efectoras quando comparada com a classe II, constituída pelos tipos II, V e VI, na qual uma única endonuclease guiada por RNA é necessária para culminar na clivagem da dupla cadeia de DNA. Devido à simplicidade da classe II, esta é mais amplamente utilizada (Lo e Qi, 2017; Makarova *et al.*, 2015; Makarova, Zhang e Koonin, 2017). O domínio PAM (do inglês, protospacer adjacent motif), uma pequena sequência de 3 nucleótidos localizada imediatamente *downstream* da região de reconhecimento e clivagem no genoma-alvo desempenha um papel essencial no tipo II.

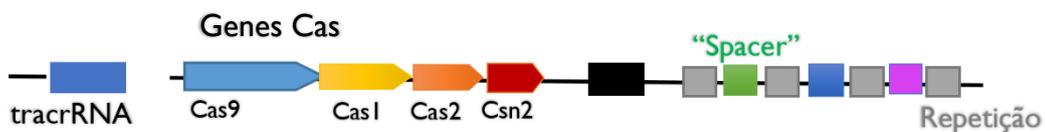


Figura 2: Estrutura geral do locus CRISPR. Como se vê na imagem, o locus CRISPR está associado a um conjunto de genes, muitas vezes denominado operação cas (DOUDNA e CHARPENTIER, 2014), que codificam para helicases e nucleases. Cada uma das unidades espaçadoras variáveis reporta-se a fragmentos de DNA de origem viral ou plasmídica, interespçados por repetições palindrômicas curtas. A presença do tracr-RNA é um componente chave no sistema CRISPR tipo II para o processamento do pre-crRNA e formação/acomodação do complexo com a Cas9.

4. CRISPR-Cas 9 (Tipo II)

O Sistema CRISPR-Cas 9, primeiramente identificado no *Streptococcus pyogenes*, é de tipo II e requer apenas 4 proteínas Cas (Lee *et al.*, 2016). Tudo se inicia com a **fase de aquisição** (Figura 3), quando há exposição ao DNA estranho, nesta fase o sistema incorpora um pequeno segmento de DNA (protospacer), através das proteínas Cas 1 e Cas 2, que se intercalará entre as repetições palindrômicas curtas, formando o *array* CRISPR. Quando ocorre uma reexposição, ocorre a **fase de expressão** como parte da resposta imune, em que há a transcrição do locus CRISPR, num longo pré-CRISPR RNA (pre-crRNA), juntamente com um componente-chave identificado por Charpentier e colaboradores, o CRISPR-RNA transactivador, (tracrRNA). Este último, emparelha com as repetições do pre-crRNA, e, posteriormente, a RNase III, do hospedeiro, procede a uma clivagem, por forma, a produzir os crRNAs maduros (Jiang e Doudna, 2015; Lee *et al.*, 2016; Wright, Nuñez e Doudna, 2016). O tracrRNA é essencial por facilitar o processamento do pre-crRNA e formação do complexo com a Cas9 (Mali, Esvelt e Church, 2013).

A última fase, será a **fase da interferência**, onde ocorre a clivagem da dupla cadeia de DNA, pela Cas9. No entanto, e por se tratar de um sistema tipo II, como referido já no ponto 3, é necessário que o complexo crRNA:tracrRNA:Cas9 encontre a sequência PAM, imediatamente abaixo do local-alvo no DNA invasor, para ocorrer a clivagem (Lee *et al.*, 2016;

Wright, Nuñez e Doudna, 2016). Muitos sistemas tipo II têm diferentes requisitos para a PAM, no entanto, o mais comum é a sequência NGG, onde N pode assumir qualquer nucleótido e G o nucleótido guanina (Jinek *et al.*, 2012). Em resumo, o sistema endógeno tem pelo menos três componentes (Cas 9, crRNA maduro, tracrRNA), além do essencial reconhecimento do domínio PAM (Hsu, Lander e Zhang, 2014).

No entanto, é possível condensar o sistema em dois componentes, mediante junção do crRNA e tracrRNA num único RNA guia (sgRNA), o que facilita a engenharia desta ferramenta (Jinek *et al.*, 2012). A clivagem efetuada pela Cas9 desencadeia as vias de reparação de danos no DNA, usadas como estratégia para a manipulação genómica (Hsu, Lander e Zhang, 2014). Com este sistema, a atividade de nuclease da Cas9 pode ser direcionada a qualquer sequência de DNA do tipo N₂₀ - NGG, pelo que basta alterar os primeiros 20 nucleótidos do sgRNA, que apresentam complementaridade com a sequência-alvo e guiam a Cas9 (Mali, Esvelt e Church, 2013; Sander e Joung, 2014). Esta simplicidade de engenharia comporta vantagens no que concerne à manipulação simultânea de múltiplos genes, possibilitada por múltiplos RNAs guia (Hsu, Lander e Zhang, 2014).

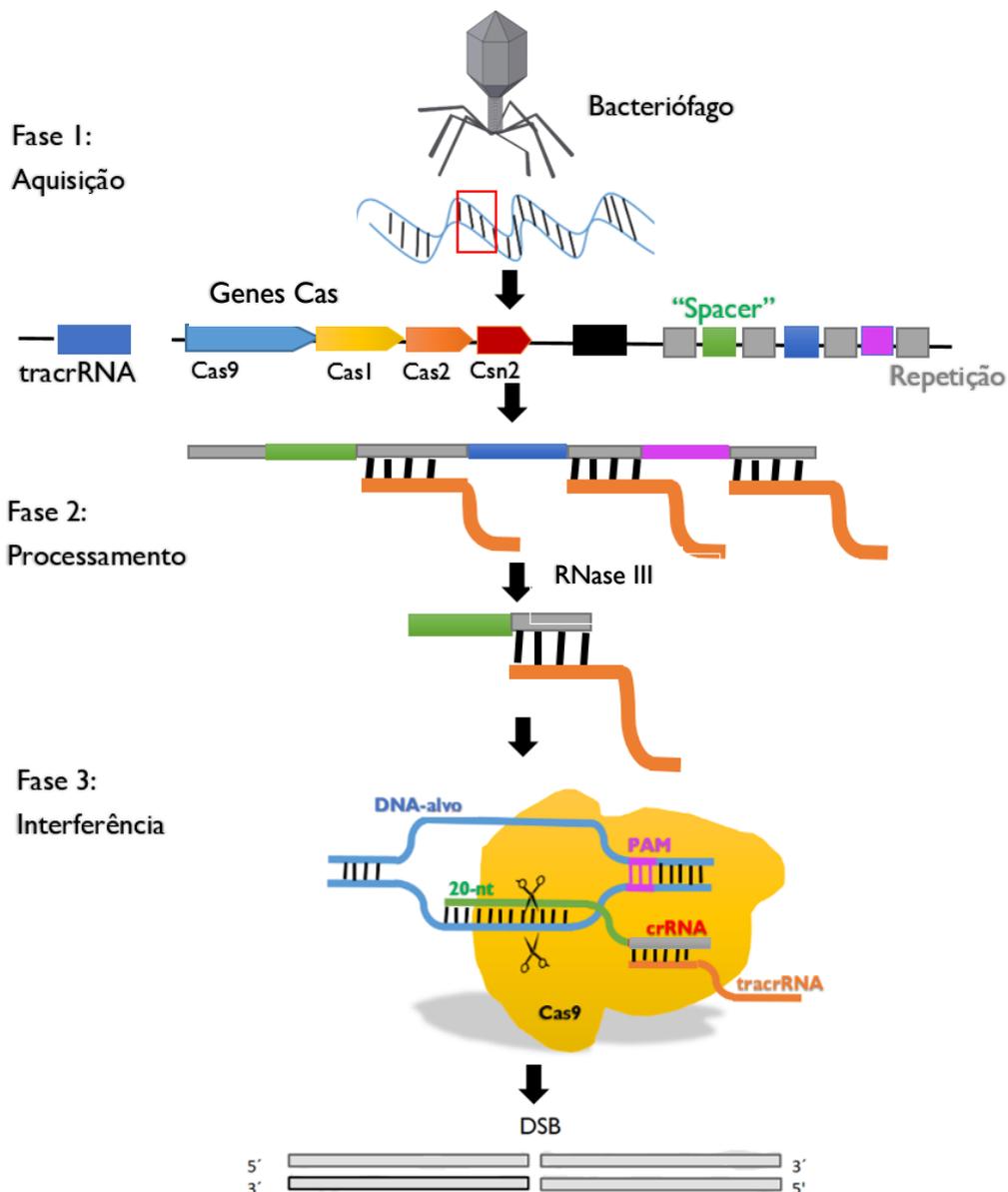


Figura 3: Primeiro ocorre a **fase de aquisição**: exposição ao DNA estranho, nesta fase o sistema incorpora um pequeno segmento de DNA ("spacer"), através das proteínas Cas 1 e Cas 2, que se intercalará entre as repetições palindrômicas curtas, no array CRISPR. Quando ocorre uma reexposição, ocorre a **fase de expressão**, em que há a transcrição do locus CRISPR, num longo pré-CRISPR RNA (pre-crRNA), juntamente com o trans-ativador CRISPR-RNA, (tracrRNA). Este último, emparelha com as sequências repetidas do pre-crRNA, e, posteriormente, a RNase III, do hospedeiro, cliva as sequências repetidas, por forma, a produzir os crRNAs maduros. A última fase, será a **fase da interferência**, onde ocorre a clivagem da dupla cadeia de DNA, pela Cas9, 3bp a montante da sequência trinucleotídica. Efetivamente, por se tratar de um sistema tipo II, é necessário que o complexo crRNA:tracrRNA:Cas9 encontre a sequência PAM, imediatamente a jusante ao local-alvo no DNA invasor, para ocorrer a clivagem (Adaptado de HSU et al., 2014).

4.1 Organização estrutural e arquitetura da Cas 9 e variantes

A Cas9 é o componente do sistema CRISPR responsável pela produção da clivagem dupla da cadeia de DNA (DSBs). Trata-se de uma proteína com 2 domínios nucleases, o RuvC-like e o HNH. Este último é composto por um único domínio, enquanto que o domínio RuvC se encontra dividido em 3 subdomínios, RuvC I perto da região N-terminal da Cas 9 e os

outros dois, RuvC II/III flanqueando o domínio HNH, no centro da proteína (Hsu, Lander e Zhang, 2014). O domínio HNH cliva a cadeia de DNA complementar ao crRNA, por sua vez, o domínio RuvC cliva a cadeia oposta à complementar (Jinek *et al.*, 2012). Através de microscopia eletrônica e cristalografia raios-x, demonstrou-se que ocorre uma alteração conformacional da proteína quando liga o RNA guia, com a formação de um canal central que separa dois lobos da proteína, e que acomoda o heteroduplex de RNA (Jinek *et al.*, 2014; Nishimasu *et al.*, 2015). Uma α -hélice rica em arginina funciona como uma dobradiça entre os dois lóbulos e, além disso, parece ter um papel fulcral na ligação à sequência-alvo, sendo ponto de contato com a sequência-semente (*seed*, 8 a 12 nucleótidos) (Hsu *et al.*, 2013; Jinek *et al.*, 2014; Mali, Esvelt e Church, 2013; Nishimasu *et al.*, 2015). Foi demonstrada também a existência de dois lóbulos com diferentes funções, sendo um para reconhecimento (REC) e um de nuclease (NUC). Quanto ao domínio de reconhecimento, este interage com o DNA de diversas formas, dependendo da conformação adotada, pelo que se demonstra que a Cas9 não possui nenhuma especificidade no que concerne ao direcionamento, sendo essencial a presença do RNA guia (Jinek *et al.*, 2014).

Diversos estudos mecânicos demonstram que o domínio PAM é imprescindível e que, na sua ausência, ainda que haja uma completa complementaridade entre o sgRNA e o local-alvo, a clivagem não acontece. A estrutura cristalina do complexo com o RNA guia e a dupla hélice de DNA-alvo demonstram que o domínio PAM se situa no interior da estrutura de bases emparelhadas (Jinek *et al.*, 2014). O reconhecimento do local-alvo satisfaz diversos requisitos, seja pela obrigatoriedade do domínio PAM, pela complementaridade com o RNA guia, ou ainda, a nível conformacional. Isto porque o DNA é passado por difusão tridimensional pela Cas9, seguindo-se um diferencial no tempo de ligação que permite a distinção entre sequências *on* e *off-target*, dado que a semivida de ligação numa região *off-target* é curta. Todos estes mecanismos são essenciais para a especificidade da Cas9 (Sternberg *et al.*, 2015).

Existem variantes da Cas9, que se caracterizam pela disrupção de um dos domínios nuclease (*nickases*) (Figura 4) ou dos dois (*deadCas9*). Como exemplo, a D10A com mutação no domínio RuvCI e a H840A com mutação no domínio HNH, que resultam em quebras simples em apenas uma das cadeias de DNA (SSB), que pode ser na cadeia não complementar ou na cadeia complementar (Makarova *et al.*, 2006; Sander e Joung, 2014). O uso de *nickases* pode ser um meio de aumentar a taxa de HDR, visto que as SSBs são maioritariamente reparadas por vias de alta fidelidade e raramente por NHEJ (Mali, Esvelt e Church, 2013). Assim, o uso de *nickases* diminui o potencial *off-target*, porém tem como limitação a obrigatoriedade de dois RNAs guia, para induzir uma quebra das duas cadeias de DNA (DSB),

bem como o requisito de 2 sequências sgRNA/PAM suficientemente próximas na mesma região-alvo, o que limita a escolha do RNA guia. Quanto à dCas9, esta apresenta os dois domínios inativados pelo que ao ligar-se ao DNA age por impedimento estereoquímico, impedindo a RNA polimerase e, como tal, a transcrição.

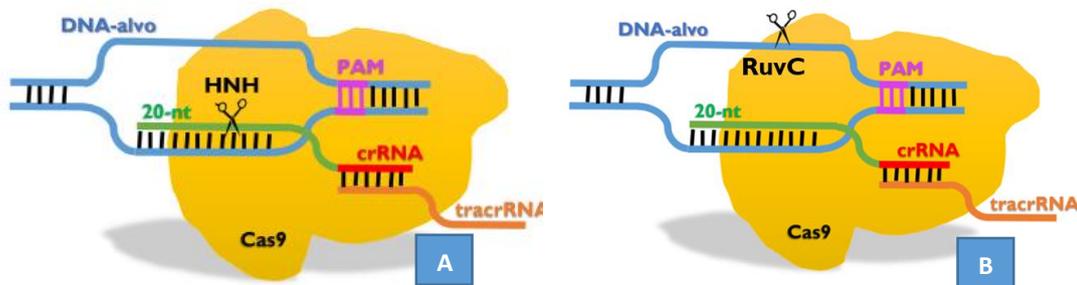


Figura 4: Existem variantes da Cas9 que se caracterizam pela disrupção de um dos domínios nucleases (nickases) ou dos dois (deadCas9). Como exemplo, a D10A (B) com mutação no domínio RuvC1 e a H840A (A) com mutação no domínio HNH, que resultam em quebras simples na cadeia de DNA (SSB), que podem ser na cadeia não complementar (B) ou na cadeia complementar (A), respetivamente. O uso de nickases pode ser um meio de aumentar a taxa de recombinação homóloga e, portanto, uma reparação mais fidedigna que possibilita a inserção de mutações específicas.

4.2 PAM (do Inglês, Protospacer Adjacent Motif)

Como foi anteriormente referido, o domínio PAM é imprescindível e, na sua ausência, ainda que haja uma total complementaridade entre o sgRNA e o local-alvo, a clivagem não acontece (Jinek et al., 2014). Esta sequência caracteriza-se por ser curta, altamente conservada e localiza-se junto à extremidade 3' no DNA-alvo, imediatamente abaixo do local de corte. No entanto, esta sequência não faz parte do sgRNA (Heler, Marraffini e Bikard, 2014; Hsu, Lander e Zhang, 2014). Vários estudos demonstram um papel de preponderância na PAM nas fases de aquisição do “spacer” e de interferência (clivagem). Isto justifica-se pelo seguinte: só há adaptação da maquinaria em prol da aquisição do “spacer” quando o genoma-estranho exibe a sequência PAM, isto consolida o facto de que nem todas as sequências dos bacteriófagos são iguais para o sistema CRISPR e ainda mutações na sequência PAM, nos tipos I e II, impedem a clivagem pela nucleases Cas (Heler, Marraffini e Bikard, 2014; Jinek et al., 2012). Assim, entendemos facilmente que um mecanismo de resistência a este mecanismo de imunidade é a mutação na sequência PAM (Heler, Marraffini e Bikard, 2014). Esta sequência é particularmente importante na discriminação entre *self* e *non-self*, pelo que se justifica a sua inexistência nas repetições do locus CRISPR (Shah et al., 2013). Este facto é importante para evitar um mecanismo de autoimunidade, pois caso a PAM estivesse presente, endogenamente, a Cas9 teria capacidade para clivar a sequência da CRISPR, visto que funciona mediante a complementaridade de bases e a presença da PAM (Heler, Marraffini e Bikard, 2014). O

reconhecimento da PAM impulsiona a transição entre a conformação de ligação da Cas 9 para a conformação de clivagem, além de que, como vimos, a clivagem (por ativação dos domínios nucleases) só acontece quando há uma verificação da presença da sequência PAM, pois é imediatamente a seguir à interação entre o domínio da nuclease e a PAM que ocorre a separação da dupla cadeia de DNA, habilitando a quebra, especificamente 3 pares de bases acima desta sequência (Shui *et al.*, 2016). Esta sequência é específica de cada Cas, embora possa ser alterada. Um dos domínios mais comuns, especialmente para a Cas9 é a sequência NGG, onde N pode ser qualquer nucleótido (Hsu, Lander e Zhang, 2014).

4.3 Edição com CRISPR-Cas9

O uso desta ferramenta para a edição genômica tem sido amplamente utilizado numa variedade de tipos de células e espécies, desde linhas celulares humanas, até ao comum do murganho e rato e ainda mosca da fruta, levedura, peixe-zebra, primatas não humanos e porcos (Sander e Joung, 2014). A enzima mais utilizada tem sido a do *Streptococcus pyogenes* Cas9 (spCas9), cuja sequência PAM é NGG, que estatisticamente está presente a cada 8 nucleótidos assim permite, teoricamente, que qualquer local do genoma possa ser editado (Powell *et al.*, 2017). Esta enzima pode ser direcionada ao local-alvo pretendido, quer por duplo-RNA, resultando do crRNA emparelhado com o tracrRNA, quer por uma quimera, que deriva da fusão destes dois RNAs, num único RNA guia (sgRNA) (Figura 5). Obviamente, pela facilidade de engenharia torna-se mais cómodo a utilização de um único RNA guia, que mantém a sequência complementar ao local-alvo (aproximadamente 20 nucleótidos), bem como a estrutura “scaffold” que auxilia a acomodar e organizar os vários domínios do complexo ribonucleoproteico (Hsu, Lander e Zhang, 2014; Mali, Esvelt e Church, 2013; Nishimasu *et al.*, 2015). Assim, o design do sgRNA tem uma enorme importância, pois é este que guiará a nuclease até ao local de interesse. Com o advento da tecnologia CRISPR houve o desenvolvimento de inúmeras ferramentas bioinformáticas para uma conceção rápida e fácil do RNA guia (Hay *et al.*, 2016). O único requisito é que o gene para o qual é desenhado um sgRNA complementar, exiba a sequência PAM, imediatamente a jusante ao local de corte (Hsu, Lander e Zhang, 2014). Observaram-se níveis elevados de junção não homóloga de extremidades (NHEJ), que induz inserções ou deleções ao acaso, quando se usa um sistema com duplo-RNA comparado com o uso de um sgRNA “scaffold” (Cong *et al.*, 2013). Os dados anteriores são úteis para a escolha do sistema a utilizar mediante o objetivo final, seja a disrupção de genes ou a introdução de uma mutação específica. Além disto, para a escolha da sequência alvo, quando é pretendido um *knock-out* escolhe-se preferencialmente a região de um domínio proteico essencial ou exão 5'. Quando o objetivo é a introdução de uma mutação

específica, via recombinação homóloga (HR), além dos 2 componentes já relatados (sgRNA e cas9) deve também ser acoplado um template homólogo dador, um oligonucleotídeo em cadeia simples, que será integrado no local danificado e a sequência-alvo escolhida deverá ser a região que se pretende alterar (Lee et al., 2016).

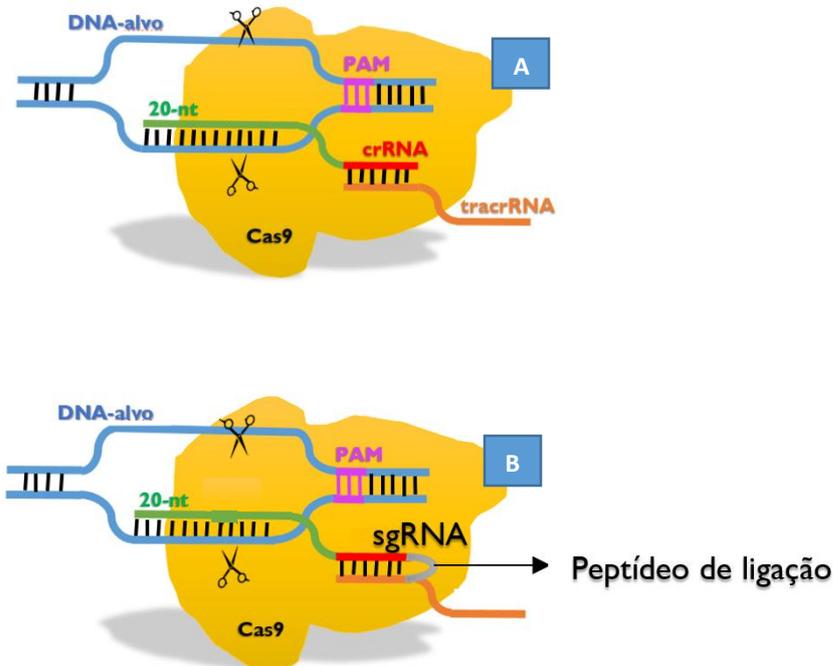


Figura 5: A cas9 mais utilizada tem vindo a ser a do *Streptococcus pyogenes* Cas9 (*spCas9*) e esta pode ser direcionada ao local-alvo pretendido quer por duplo-RNA (A), resultando do crRNA emparelhado com o tracrRNA ou por uma quimera, que deriva da fusão destes dois RNAs, através de um peptídeo, num único RNA guia (sgRNA) (B) O único requisito é que o gene para o qual é desenhado um sgRNA complementar, exiba a sequência PAM, imediatamente a jusante ao local de corte.

A implementação deste sistema num determinado organismo obriga a uma reconstituição do complexo crRNA:tracrRNA:Cas9 ou utilização da quimera sgRNA:Cas9 como uma unidade funcional. A utilização deste sistema em ambiente humano, requer a expressão da proteína Cas9 derivada de um codão humano otimizado, com sinal de localização nuclear apropriado (Jinek et al., 2013).

4.4 Métodos de entrega dos reagentes CRISPR

A eficiência da edição genética correlaciona-se com a eficiência da entrega dos componentes do sistema CRISPR. Existem vários formatos a considerar quando falamos em sistema CRISPR: entrega dos genes que codificam para o sgRNA e a Cas9 (DNA) via plasmídeo ou via vetores virais numa estratégia designada “*gene-based delivery*”; entrega do mRNA que codifica para a Cas9 juntamente com o sgRNA numa estratégia designada “*RNA-based delivery*” ou ainda entrega da própria proteína Cas9 a par do sgRNA numa estratégia “*protein-based delivery*” (Jacobi et al., 2017; Mout et al., 2017; Nelson e Gersbach, 2016). Quando se opta por

uma abordagem de entrega proteica, sob a forma de complexo ribonucleoproteico (RNP) devem distinguir-se duas opções: o complexo sgRNA+Cas9, onde o sgrRNA é obtido por transcrição *in vitro*; ou o complexo em que se encontram separados o tracrRNA e o crRNA + Cas9, onde os RNAs são sintetizados quimicamente, o que permite que sejam efetuadas modificações químicas que visem aumentar a estabilidade e reduzir a imunogenicidade dos RNAs estranhos (Nelson e Gersbach, 2016).

Pelo disposto anterior, torna-se fácil perceber que a entrega na forma de complexo RNP possui vantagens sobre a estratégia baseada em genes ou RNA, isto porque dispensa os passos de transcrição e tradução, encurtando o processo. Trata-se de uma expressão transitória, onde se reduz drasticamente a possibilidade de integração no genoma e os problemas de estabilidade do RNA, bem como o seu potencial imunogénico. Além disto, os potenciais efeitos em genes que não são os de interesse é diminuta, visto que a Cas9 já é entregue na forma ativa, pelo que o potencial *off-target* diminui substancialmente (Mout *et al.*, 2017).

Os métodos de entrega dos diferentes tipos de sistema CRISPR referidos são variados e incluem métodos não-virais e virais.

Os métodos não virais, incluem, entre outros:

- Microinjeção, um método físico, amplamente utilizado para manipulação em zigoto, com alta taxa de eficiência. No entanto, é um método muito laborioso, que exige um laboratório com equipamento especializado a par de pessoal treinado (Wang *et al.*, 2016).

- Eletroporação, método físico, em que se utiliza uma corrente elétrica para aumentar a permeabilidade celular. É um método muito utilizado em células difíceis de transfectar ou culturas celulares primárias. Este método necessita de uma maior concentração de componentes CRISPR devido à morte celular decorrente da aplicação do campo elétrico, além de que não há proteção contra as nucleases (Gori *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016).

- Transfecção mediada por lípidos, método químico, uma das técnicas mais comuns de entrega de ácidos nucleicos, por interação do grupo fosfato dos nucleótidos com as cargas positivas dos lípidos catiónicos. Esta técnica encapsula os reagentes CRISPR protegendo-os da ação de nucleases. A escolha deste processo a par da estratégia de entrega proteica coloca porém mais um desafio, visto que a Cas9 tem uma carga ligeiramente positiva, que pode dificultar a formação dos lipossomas (Yu *et al.*, 2016). A resolução do fato anterior pode ser levada a cabo pela preparação do complexo RNP, em que as cargas negativas do sgRNA colmatam esta positividade ou a transformação da Cas9 com adição de um *tag* com resíduos de ácido oligoglutâmico no N-terminal da proteína Cas9 (Mout *et al.*, 2017). Em relação à

eletroporação, esta técnica apresenta vantagem econômica, devido ao baixo consumo de reagentes (Cas 9 e sgRNA) e não requer equipamentos específicos, nem consumíveis (Jacobi *et al.*, 2017).

Apesar de tudo, a estratégia preponderante em organismos na fase pós-natal e em células humanas é, efetivamente, através de vetores virais. A chave está em aproveitar o genoma do vírus que permite a expressão do transgene mas modificar ou remover o genoma viral remanescente, que é responsável pela patogenicidade, incluindo a replicação viral e tradução no hospedeiro (Wykes e Lignani, 2017). Os tipos de vetores mais utilizados são derivados dos adenovírus, lentivírus (LV) e vírus adeno-associados (AAV) (Gori *et al.*, 2015). Os LV resultam numa expressão prolongada sem resposta imunitária significativa e têm uma capacidade de carga maior quando comparado com os AAVs, no entanto, há um risco de inserção mutagénica, devido à sua capacidade de integração. Os LV não podem ser administrados sistemicamente, sendo obrigatória a injeção direta no cérebro (Wykes e Lignani, 2017). Já os AAVs apresentam igualmente um baixo potencial de imunogenicidade, no entanto, a sua limitação é a baixa capacidade de carga (aproximadamente 4.5kb), o que requer a construção de vetores virais AAV separados para acomodarem, individualmente, a Cas9, a sgRNA e ainda o template homólogo dador, quando aplicável para despoletar a HDR. O uso de Cas9 mais pequenas pode ser uma abordagem para contornar este obstáculo, tais como por exemplo, a Cas 9 do *Staphylococcus aureus* (Doetschman e Georgieva, 2017). Apesar disto, são, correntemente, os vetores mais utilizados apresentando a vantagem de, raramente, sofrerem integração quando comparados com os LV, visto que permanecem, habitualmente, na forma episomal. Além disto, alguns serotipos têm a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica o que possibilita a administração por via sistémica, sendo muito menos invasivo, quando comparamos com uma injeção direta no cérebro (Gray *et al.*, 2010).

4.5 Especificidade e eficiência da nuclease Cas9

Uma vez que a modificação genética leva a alterações permanentes no genoma, há a preocupação de que o direcionamento à sequência de interesse não detenha falhas, visto que, estes erros são fonte de uma instabilidade genómica grosseira. Tendo em conta que a Cas9 reconhece o alvo com base no emparelhamento de bases complementares, existem ensaios que permitem avaliar, sistematicamente, o efeito de *mismatches* na sua atividade enzimática (Hsu, Lander e Zhang, 2014). Diversos estudos revelam uma sequência semente caracterizada pelos primeiros 8-12 nucleótidos próximos da PAM, responsável pela especificidade da Cas9 (Cong *et al.*, 2013). Outros estudos revelam, ainda, que esta enzima tem capacidade de tolerar algumas mudanças no quadro de leitura (mutações *mismatches*), dependendo do número e

posição. Os *mismatches* mais tolerados são fora da região semente, pelo que devem encontrar-se num plano distal à sequência PAM (Hsu, Lander e Zhang, 2014). É sabido que é requerida uma elevada homologia entre o RNA guia e o DNA alvo para se proceder à clivagem, no entanto, o interessante é que, apesar disso, a Cas9 pode permanecer, transitoriamente, ligada a locais com pequeno comprimento de complementaridade, o que é sugestivo que a Cas9 tenha múltiplos locais de ligação fora do alvo, no entanto, apenas cliva uma pequena fração destes (Wu *et al.*, 2013). Foi demonstrado que a Cas9 consegue tolerar até 5 *mismatches* por cada local-alvo, o que justifica a interferência da concentração enzimática da nuclease nos potenciais efeitos *off-target*. Tal facto sugere que elevadas concentrações da enzima toleram um maior número de *mismatches*, levando a maiores taxas de mutagénese (Hsu *et al.*, 2013). Assim, a redução da concentração de Cas9 poderá aumentar a eficiência enzimática promovendo a clivagem no alvo correto. Pelo disposto anterior, é importante para cada manipulação genética que se pretenda efetuar, seja feito um estudo computacional que determine as sequências genómicas com elevada similaridade com o *locus* desejado, de forma a prever os potenciais efeitos *off target* e avaliar a necessidade de alterar a sequência-alvo (Hsu, Lander e Zhang, 2014), pois a sequência-alvo ideal será aquela que é única.

5. Utilizações da CRISPR no domínio das neurociências

As doenças do cérebro têm um enorme impacto na sociedade, bem como na economia, a nível mundial. Muitas destas doenças caracterizam-se por serem doenças crónicas e incapacitantes, para as quais as opções terapêuticas existentes são inadequadas e ineficientes, sendo, na sua maioria, apenas destinadas à melhoria sintomática. A elevada taxa de insucesso no desenvolvimento de fármacos e medicamentos destinados ao sistema nervoso central têm levado a alguma redução do interesse e investimento da indústria farmacêutica nesta área terapêutica. Uma das falhas críticas está associada à deficiente capacidade dos modelos animais para reproduzirem a doença neurológica de forma relevante e que permita extrapolação para o homem. Assim são necessários modelos animais que mimetizem tão fielmente quanto possível as alterações neuropatológicas e comportamentais observadas nos doentes e que possam ser equiparáveis em ensaios não-clínicos (Jennings *et al.*, 2016).

A emergência de ferramentas como a CRISPR, com capacidade de manipulação genética, de forma simples e precisa, veio possibilitar a criação de modelos de doenças mais fidedignos, por disrupção da sequência codificante ou introdução de uma sequência específica para reprodução do quadro genético patológico (Heidenreich e Zhang, 2015). O sistema CRISPR assume assim enorme importância no campo das neurociências, no que concerne à capacidade de manipulação em diferentes organismos, incluindo os primatas não-humanos,

como macacos, que são modelos relevantes no estudo do cérebro, colmatando assim uma dificuldade antiga na produção de modelos de doença em animais de maior porte devido às dificuldades associadas ao acesso a células estaminais embrionárias destas espécies (Tu *et al.*, 2015; Yang e West, 2016). Como é fácil de depreender, estes modelos de doença são particularmente relevantes por facilitarem o desenvolvimento farmacêutico, nomeadamente, no que compete ao estudo da fisiopatologia de inúmeras doenças neurológicas, à descoberta de potenciais alvos para tratamento, bem como de biomarcadores da progressão da doença e ainda nos ensaios não clínicos, para estudar a atividade de princípios ativos (Jennings *et al.*, 2016). Além disto, ainda que continuem a ser preferidos os murganhos, por questões de instalações, custos e equipamentos, a CRISPR continua a ser vantajosa nestes animais, nomeadamente pelos custos e tempo reduzido para introduzir até múltiplas mutações no genoma destes roedores, tornando disponível a etapa não-clínica muito rapidamente. Verifica-se, assim, uma redução de anos de experimentação com dispendiosos recursos, inclusivé múltiplos passos de cruzamentos e criação, para meses, quando há manipulação múltipla (Heidenreich e Zhang, 2015).

5.1 Modelos celulares

Uma abordagem para gerar modelos de doenças neurológicas humanas *in vitro* são as células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC), para a criação de modelos celulares de determinada doença (Heidenreich e Zhang, 2015).

As iPSCs são obtidas a partir de células somáticas mediante reprogramação ao estado embrionário estaminal, mantendo a herança genética do dador, e recuperando as características de capacidade de divisão ilimitada e pluripotência (podem originar qualquer tipo de célula ou tecido, com exceção dos tecidos extraembrionários). As possibilidades de utilização não têm precedente: é agora possível colher células somáticas, por exemplo fibroblastos da pele, de um dador com determinada doença neurológica, reprogramá-las em células estaminais e de seguida induzir a diferenciação destas, por exemplo, em neurónios, permitindo produzir um modelo neuronal *in vitro* da doença, em células que de outra forma estariam inacessíveis. Existem variados exemplos disto, no domínio das doenças neurológicas, como na doença de Parkinson (Soldner *et al.*, 2009), esquizofrenia (Brennand *et al.*, 2011), doença de Huntington (Zhang, 2010) e doença de Alzheimer (Hossini *et al.*, 2015).

No entanto, existe uma diversidade genética elevada que contribui para variáveis de confusão que dificilmente são destrinçadas, pelo que este background não fideliza os resultados de estudos, como por exemplo, a resposta a fármacos. Assim, o uso da ferramenta CRISPR veio melhorar os modelos celulares conseguidos por estas células dado que permite a

introdução ou remoção de uma aberração genética específica usando a capacidade de clivagem em dupla cadeia da CRISPR e, posterior, estimulação dos mecanismos de reparação de DNA. Obtêm-se assim linhas celulares isogênicas com e sem a mutação que permitem estudar a doença neurológica num ambiente genético idêntico, libertando os estudos da intervariabilidade de genótipo. Estes modelos iPSCs são, portanto, plataformas promissoras para o screening de fármacos, bem como para o estudo de processos, fluxos e vias afetados por uma determinada mutação (Figura 6) (Liu et al., 2016; Tai et al., 2016). (**Anexo 12**)

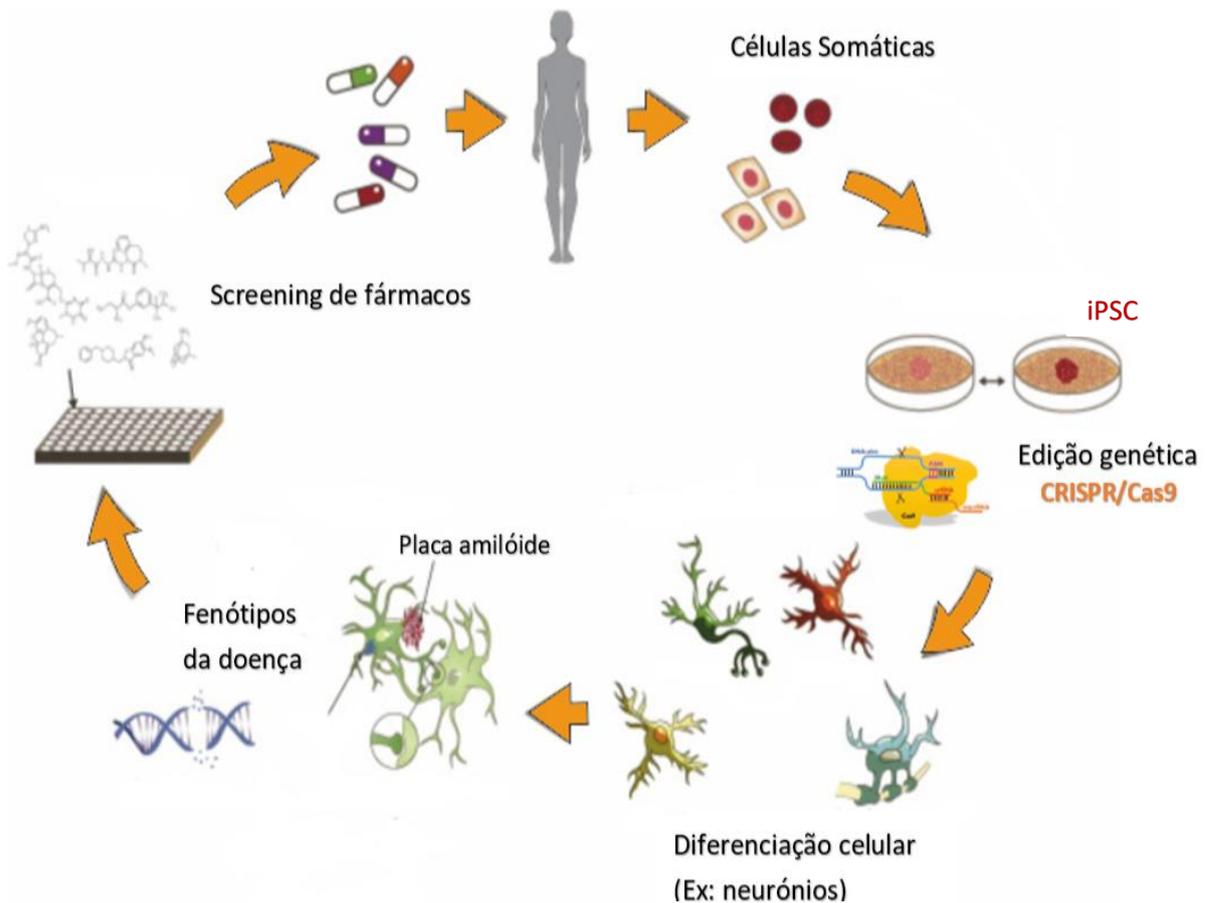


Figura 6: As iPSCs são obtidas a partir de células somáticas mediante reprogramação ao estado embrionário estaminal e recuperando as características de capacidade de divisão ilimitada e pluripotência podem originar qualquer tipo de célula. Com uma ferramenta de edição genómica precisa como a CRISPR/Cas9 é possível eliminar a diversidade genética de fenótipo, permitindo gerar linhas celulares isogênicas com e sem a mutação que permitem estudar a doença neurológica. Estes modelos de iPSCs são plataformas muito promissoras para o screening de fármacos (Adaptado de Mungenast et al., 2015).

5.2 Modelos animais

Os modelos animais permitem uma representação do cérebro humano com elevada relevância fisiológica e têm sido extensamente utilizados no estudo de doenças neurológicas.

Visto que muitas destas doenças neurodegenerativas são causadas por mutações genéticas, a capacidade da CRISPR de direcionamento preciso a qualquer gene, abre portas para a geração de novos modelos animais mais perfeitos e relevantes.

5.2.1. Roedores

Os modelos roedores transgênicos têm sido fonte de informações valiosas acerca de diversas doenças neurológicas, nomeadamente no que concerne ao desenvolvimento da neuropatologia, percepção dos sintomas progressivos e dependentes da idade, na demonstração de acumulação de agregados proteicos, na expressão de proteínas mutantes, entre outros.

A tecnologia CRISPR permite produzir modelos em roedor de forma mais perfeita e eficiente do que era até aqui possível. Com a CRISPR é possível introduzir de forma precisa uma mutação no gene desejado, mantendo o seu promotor endógeno – modelos *knock in*, que até aqui eram mais difíceis de produzir. Permite também introduzir múltiplas mutações (Ex: *knock-out* de três metiltransferases de DNA: Dnmt1, 3a e 3b em murganhos (Swiech *et al.*, 2015) ou polimorfismos de forma mais rápida e precisa, excluindo vários passos de cruzamento e criação, necessários às técnicas tradicionais (Heidenreich e Zhang, 2015). Assim, os modelos de roedores transgênicos começam a ser amplamente utilizados porque além de modelos *knock-out*, por exemplo, modelo *knock-out* do gene *Mecp2* (gene relacionado com a memória) (Swiech *et al.*, 2015), permitem ainda a modificação precisa do genoma com a criação de patologias por inserção de mutação específica, por exemplo, modelo de roedor da doença de Huntington.

Os modelos em roedor têm, no entanto, limitações, pelas diferenças profundas que se manifestam, por exemplo, no desenvolvimento rápido do cérebro (21 dias vs mais de 150 dias, quando falamos em primatas); na curta duração média de vida e, em alguns casos, na expressão génica dependente de um promotor exógeno. Assim, entende-se que os modelos roedores não reproduzem completamente neuropatologia observada nos doentes humanos. Temos, como exemplo disso, a neurodegenerescência limitada ou inexistente nalguns modelos das doenças de Alzheimer e Parkinson (Tu *et al.*, 2015).

5.2.2. Primatas não humanos

Em alguns casos, para um melhor entendimento do cérebro humano, são então necessários primatas não humanos, cujo cérebro é mais próximo do humano, quer em termos neuroanatômicos, fisiológicos e comportamentais. Diversos sintomas clínicos de perturbações neurológicas devem-se a uma atividade cognitiva superior controlada pelo córtex pré-frontal, mais desenvolvido à semelhança do Homem nos primatas não humanos do que nos roedores;

sistemas de recetores específicos apresentam diferentes conectividades entre roedores e primatas, além do facto de que muitos fármacos usados para tratar patologias do SNC têm implicações nos sistemas de neurotransmissão e neuromodulação, sistemas que diferem bastante entre estes dois *taxa*, sendo que os primatas não humanos aproximam-se mais do homem, constituindo uma melhor plataforma para o *screening* deste tipo de fármacos. Outra vantagem dos modelos de doença em primatas é permitirem estudar fenótipos no estágio prodrómico da doença, que são difíceis de estudar em doentes humanos, mas são importantes, dado que permitem identificar oportunidades de tratamento precoce. Os modelos roedores podem não ser indicados para este propósito dado que têm um desenvolvimento cerebral muito rápido (Jennings *et al.*, 2016). Em resumo, no domínio das neurociências o sistema CRISPR e os modelos de primatas não-humanos são promissores aliados na descoberta de novos tratamentos, pelo que existem já exemplos da sua utilização (Liu *et al.*, 2017; Zuo *et al.*, 2017).

5.3 Uso do Sistema CRISPR para gerar modelos de doenças neurodegenerativas, em primatas

Sintetizando os passos a seguir para criação de primatas transgénicos com a mutação da doença pretendida com recurso a esta ferramenta, temos que: Primeiramente, deve efetuar-se uma avaliação da sequência do gene de interesse (seja para disrupção ou introdução de uma sequência específica). De seguida, para a escolha do segmento-alvo deve verificar-se cumprimento do requisito da PAM, para então se poder prosseguir com o desenho do RNA guia complementar. Por forma a agilizar o design e validação desta sequência-alvo deve utilizar-se uma ferramenta bioinformática (**Anexo I3** e **Anexo I4**) que faz uma avaliação do potencial *off-target* da sequência, para se evitar uma clivagem fora do local de interesse.

Dado que o objetivo final é a geração de modelos de primatas, deve haver uma recolha prévia de oócitos de fêmeas após a superovulação. Estes serão então submetidos a uma injeção intracitoplasmática de esperma para fecundação e formação de zigotos. Os ovos fertilizados serão de seguida alvo de injeção intracelular com os RNAs guias e a Cas9 e ainda, quando aplicável, de um template dador homólogo que possibilitará a reparação da quebra dupla por recombinação homóloga (Chen *et al.*, 2016). A Cas9 pode ser co-injetada na forma de proteína, RNAm ou de plasmídeo (DNA) que codifica para a Cas9. A expressão dos RNAs guia pode ser dependente de promotores, como o promotor U6 utilizado pela polimerase III que contém como requisito para a sequência crRNA, a exigência de começar com o nucleótido guanina, pelo que a especificidade neste caso é dada por GN₂₀NGG_{PAM} (Hay *et al.*, 2016). Assinale-se ainda que para editar as células de mamíferos (eucarióticas) é necessário

que a Cas9 esteja acoplada a um sinal de localização nuclear para a encaminhar para o compartimento do genoma. (Hay *et al.*, 2016) É de notar, que a RNase III da bactéria (*Streptococcus pyogenes*) não é essencial para a conclusão do processo, o que indica que outras enzimas do hospedeiro podem ser usadas para promover as suas ações, como o processamento e a maturação dos crRNAs (Cong *et al.*, 2013). Após a co-injeção (sgRNA; Cas9) nos zigotos, respeitando todas as considerações necessárias, pressupõe-se uma espera até à fase de blastocisto ou mórula para implantar os embriões nas fêmeas de aluguer.

Finalmente, após a gravidez, há o nascimento dos primatas transgênicos. Estes têm de ser analisados a fim de se verificar que manifestam a mutação (Figura 7) (Chen *et al.*, 2016). Por forma a avaliar a presença da mutação pretendida, para reprodução do modelo de doença, pode ser efetuada, por exemplo, uma sequênciação de Sanger, ou *Western Blot*, assim como ensaio para deteção de clivagem e *mismatches*, tal como como o Surveyor® (Ran *et al.*, 2013).

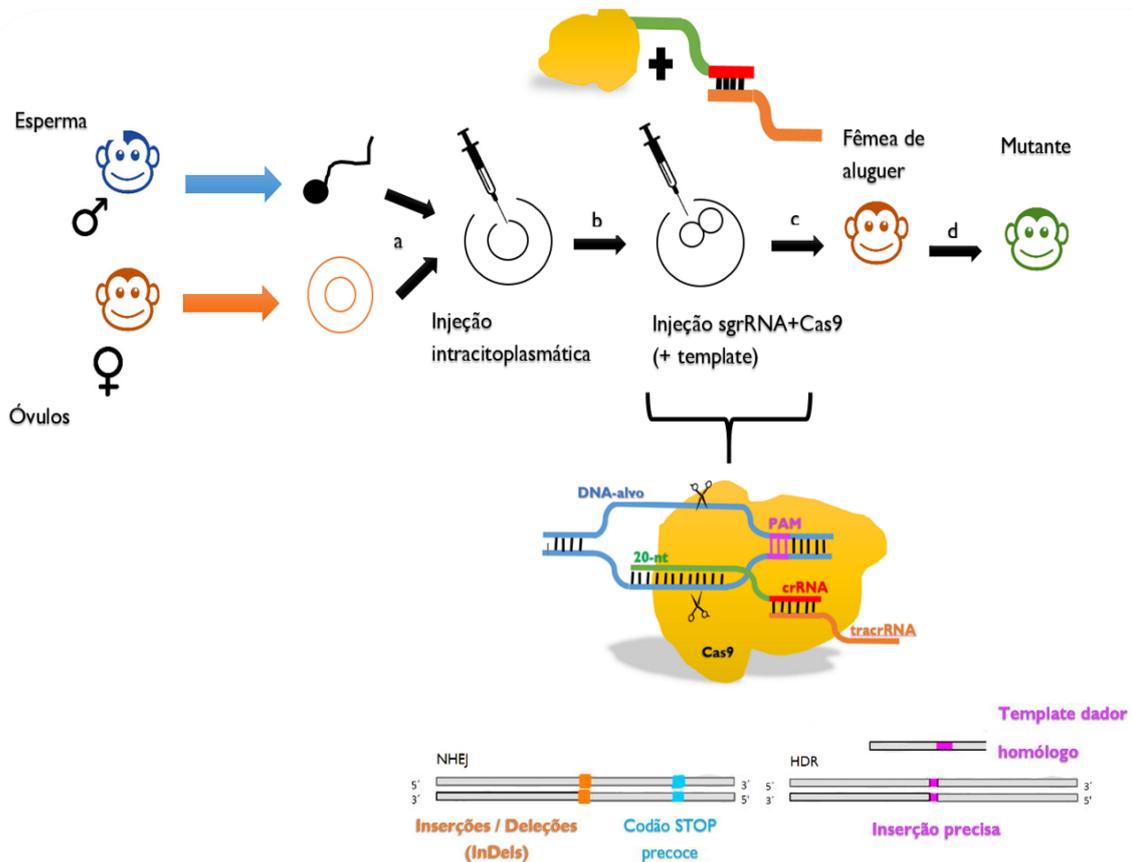


Figura 7: Produção de modelos de doenças neurodegenerativas em primatas, que são modelos animais que mais fielmente reproduzem o cérebro humano. As fêmeas primatas (não-humanos) sofrem superovulação para recolha de óvulos, os quais, posteriormente, são sujeitos à injeção intracitoplasmática de esperma (a), para fertilização *in vitro*. Os ovos fertilizados são injetados com os componentes do sistema CRISPR (b), daqui há um desenvolvimento, *in vitro*, até ao estadio de 4 a 8 células, após o qual há a transferência para a fêmea de aluguer (c). Após a gestação completa, os macacos recém-nascidos são analisados a fim de verificar a presença de transgenes no DNA-alvo (d), conhecidos por causarem determinada doença neurodegenerativa (Adaptado de TU *et al.*, 2015).

Recentemente, em vez da geração de animais transgênicos no estado embrionário, vários investigadores tentaram efetuar esta manipulação genética nos animais já nascidos. Para tal, é necessário o desenvolvimento de sistemas de vectorização dos componentes CRISPR diretamente para o SNC. A vectorização destes componentes ao cérebro pode ser efetuada de várias formas, no entanto, neste contexto a estratégia mais promissora são os vetores virais, tais como os vírus adeno-associados (AAV), com longo tempo de expressão mas sem integração, relativamente seguros e com baixa patogenicidade e imunogenicidade (Heidenreich e Zhang, 2015). Há, no entanto, várias limitações a ultrapassar, como por exemplo, a baixa capacidade de carga destes vetores virais. Uma alternativa é a entrega, separadamente, do RNA guia e da nuclease Cas9 (Figura) (Swiech *et al.*, 2015).

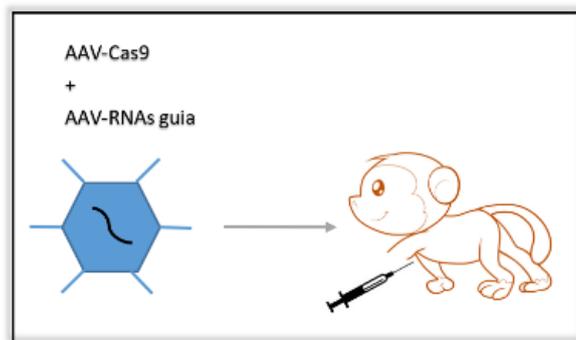


Figura 8: Uma das estratégias mais promissoras são os vetores virais, como os vírus adeno-associados (AAV), com longo tempo de expressão mas sem integração, relativamente seguros e com baixa patogenicidade e imunogenicidade. Uma alternativa para ultrapassar a sua limitação no que concerne à baixa capacidade de carga é a entrega, separadamente, em diferentes vetores virais, dos componentes CRISPR.

5.4 CRISPR e os passos para a meta de interesse: modelos de doenças do cérebro

Com o sistema CRISPR conseguimos mimetizar a base genética das doenças que acometem o cérebro e com isto desenvolver modelos animais que terão utilidade não só na clarificação da patologia, mas também como modelos para o *screening* de fármacos para a doença em questão, preenchendo lacunas terapêuticas que atualmente existem, devido à inexistência de bons modelos de doença.

Algumas doenças neurológicas como a doença de Parkinson podem ser causadas pela perda de função, e, portanto, pela disrupção na zona codificante de genes específicos, em particular, neste caso pela mutação nos genes Parkin e Pink1. Estes genes podem ser alvo do sistema CRISPR, no modelo animal pretendido, de forma a inativar a sua expressão. Assim, quando ambos os alelos são mutados, é expectável o desenvolvimento da doença de parkinson (Tu *et al.*, 2015).

No entanto, muitas outras doenças neurodegenerativas são causadas pela toxicidade de proteínas mutantes, como exemplo, a doença de Huntington é causada pela expansão poliQ

na proteína huntingtina, resultante da repetição anormal do triplete CAG no respetivo gene. Assim, para gerar este modelo de doença é exigida a inserção específica de um segmento que permita a referida expansão. Esta estratégia é referida como *knock-in* e pressupõe a ativação do mecanismo de reparação por recombinação homóloga. (Tu *et al.*, 2015). Nos neurónios, células altamente diferenciadas, com baixa atividade mitótica, a frequência de HDR é ainda mais baixa, visto este mecanismo de reparação estar sobretudo ativo na fase S e G2, do ciclo celular. Assim, têm vindo a ser estudadas abordagens para aumentar a taxa de HDR, como o uso de inibidores da outra via de reparação, NHEJ (Fellmann *et al.*, 2017; Heidenreich e Zhang, 2015; Xiong *et al.*, 2016).

6. Limitações/ Desafios da CRISPR na produção de modelos de doença do cérebro

Por tudo o que foi anteriormente descrito, é inquestionável a importância do Sistema CRISPR relativamente à criação de mutações, variantes ou polimorfismos, em qualquer local do genoma. No entanto, esta ferramenta ainda tem limitações significativas, conforme discutimos a seguir.

6.1. Potencial off-target

O direcionamento do sistema CRISPR é efetuado por um RNA guia que hibridiza com uma sequência-alvo, adjacente a um motivo PAM (NGG), através de aproximadamente 20 nucleótidos, resultando numa DSB, 3 pares de bases a montante da sequência NGG (TU *et al.*, 2015). Assim esta dependência de sequência e o facto de a Cas 9 conseguir tolerar algumas mutações, podem levar à clivagem inapropriada de sequências semelhantes mas que não são a sequência de interesse (Fellmann *et al.*, 2017). Efetivamente, foi demonstrado que os nucleótidos próximos à sequência PAM (8-12 nt), a chamada *seed sequence*, são os mais rigorosamente reconhecidos, já nos restantes nucleótidos há a probabilidade da Cas9 tolerar *mismatches*, sendo sensível ao número, posição e distribuição dessas mutações (Hsu, Lander e Zhang, 2014). A Cas9 pode ligar a um elevado número de sequências que não a de interesse, no entanto, esta ligação é transitória e, apenas, numa fração pequena dessas ligações é que ocorre a clivagem do DNA. Como a Cas9 tem esta tolerabilidade a *mismatches*, o potencial de *off-target* correlaciona-se com a concentração enzimática, sendo tanto maior, quanto maior a concentração da Cas9 (Fellmann *et al.*, 2017; Hsu, Lander e Zhang, 2014).

Existem ferramentas bioinformáticas com inúmeros algoritmos que conseguem prever a probabilidade de uma determinada sequência apresentar complementaridade com sequências semelhantes, que possam potenciar a clivagem fora do alvo (Fellmann *et al.*, 2017).

Devido a esta preocupação surgiram várias abordagens para minimizar este problema, tais como o uso de *nickases* (com domínio RuvC ou HNH inativados) que induzem quebras

em cadeia simples, pelo que aumentamos a especificidade quando comparamos com as quebras duplas num local-alvo, visto que serão necessárias 2 sequências serem simultaneamente reconhecidas (Fellmann *et al.*, 2017; Hsu, Lander e Zhang, 2014). Esta estratégia prevê o uso de um par de nickases que têm como alvos locais adjacentes em cadeias opostas, o que resulta numa DSB com um potencial *off-target* extremamente reduzido (Lee *et al.*, 2016). Outra estratégia envolve o uso de RNAs guia truncados, ou seja, com remoção de alguns nucleótidos da extremidade 5' do RNA o que diminui o comprimento da interface RNA-DNA. Os RNAs guia mais curtos apresentam maior especificidade, dado que os nucleótidos finais, próximos à extremidade 5', não sendo estritamente necessários para o direcionamento são compensações para alguns *mismatches* que possam ocorrer, logo sem estes há uma sensibilidade maior a estes *mismatches* (Fellmann *et al.*, 2017; Hsu, Lander e Zhang, 2014, Fu *et al.*, 2014). Finalmente, recorre-se ainda à adição de duas guaninas ao terminal 5', o que talvez pela modificação da estabilidade do RNA, concentração ou estrutura secundária permite aumentar a especificidade (Cho *et al.*, 2014)). É de notar que estratégias que possibilitem um ligar e desligar da cas9 minimizam a clivagem fora do alvo, visto que permitem um controlo temporal, limitando o tempo de exposição do genoma à atividade da Cas9 (Chira *et al.*, 2017). Existem várias abordagens para isto, como por exemplo, uma expressão da Cas dependente de 4-hidroxitamoxifeno (4-HT) por fusão a um domínio do recetor de estrogénio (ERT2), modulando assim a sua atividade (Liu *et al.*, 2016).(Figura 9)

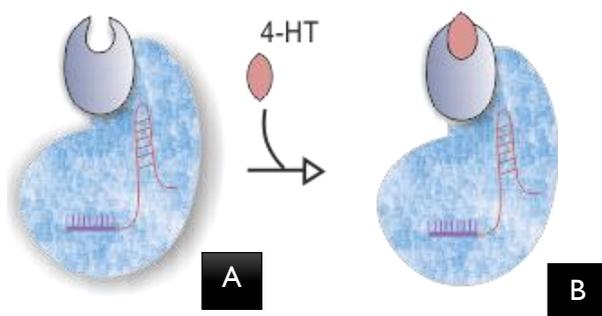


Figura 9 Uma alternativa para diminuir a atividade enzimática, e, por conseguinte, restringir o potencial *off-target* é a utilização duma expressão regulada da enzima (A: cas 9 inativa, indutível por 4-hidroxitamoxifeno (4-HT) ; B: cas 9 ativa pela ligação do 4-HT ao recetor de estrogénio ERT2). Adaptado de CHIRA *et al.*, 2017.

6.2 Mosaicismo

O mosaicismo deriva de uma falha genética durante o desenvolvimento do embrião. Neste caso, o mesmo indivíduo possui dois ou mais tipos de linhagens celulares diferentes, como consequência da variação no número de cromossomas, por perda ou duplicação destes (Stankiewicz e Lupski, 1865). As mutações em mosaico podem, efetivamente, afetar os modelos animais de doenças humanas, isto porque uma doença genética humana deriva de uma mutação que ocorre no zigoto, no estágio de primeira célula, antes de qualquer divisão celular, assim todas as células do indivíduo manifestam exatamente o mesmo fundo genético,

de forma ubíqua. O mecanismo por trás do mosaicismos permanece pouco claro, mas foi sugerido que aquando da utilização do sistema CRISPR-Cas9, tal se deve a um atraso na produção da forma ativa da Cas9 que poderá ocorrer após a primeira divisão celular (Tu et al., 2015). Este problema pode ser minimizado com entrega da proteína Cas9 em vez do RNA mensageiro que codifica para esta, com vista a eliminar o atraso da tradução (Jennings et al., 2016). No entanto, há relatos que o mosaicismos poderá não ser eliminado (Kim et al., 2014). Este problema torna-se ainda mais sério quando falamos em animais maiores como os primatas, isto porque para gerar um animal com o mesmo *background* genético, completamente *knock-out*, são necessários vários cruzamentos em série. Isto é particularmente complicado nestes animais cujo ciclo de reprodução é longo (5-6 anos) e o tamanho da ninhada é pequeno (Jennings et al., 2016; Zuo et al., 2017).

6.3 Mecanismo de reparação por homologia ineficiente em neurónios

Embora esteja patente que a NHEJ é uma via de reparação ativa nos neurónios permanece pouco clara a eficiência da via HDR nestas células altamente diferenciadas pós-mitóticas. Acredita-se que a HDR ocorre, essencialmente, nas fases S e G2 do ciclo celular, sendo portanto, um mecanismo raro em células como os neurónios. A introdução e correção de mutações via HDR, no cérebro, abriria a porta não só para a construção de determinados modelos de doença como para a terapêutica, *in vivo*. Assim, o futuro poderá passar por melhorar as vias de sinalização de forma a promover a taxa de ocorrência de HDR, nestas células (Heidenreich e Zhang, 2015). No entanto, como a NHEJ é ativa, pode ser usada para produção de InDels e reprodução de doenças causadas pela disrupção de genes ou ganho de toxicidade, como a doença de Parkinson.

Devido à sua importância, foram investigadas várias abordagens para aumentar a taxa de frequência de HDR, tais como:

- inibição da via NHEJ para ocorrer um desvio para a via concorrente, HDR. Foram identificadas pequenas moléculas inibitórias de componentes-chave da NHEJ, como moléculas inibidoras da DNA ligase IV e KU70 (Doetschman e Georgieva, 2017);

- foram identificadas duas pequenas moléculas, que aumentam a frequência de HDR, são elas: L755507 (agonista do recetor β 3-adrenérgico) e brefeldin A (inibidor da proteína responsável pelo transporte entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi) (Xiong et al., 2016);

- o uso de nickases é também uma estratégia que aumenta a reparação por homologia, visto que, as quebras em cadeia simples geradas pelas nickases são mais fielmente reparadas (Cong et al., 2013; Xiong et al., 2016).

6.4 Limitação dos mecanismos de entrega no cérebro

A vectorização dos componentes CRISPR para o cérebro pode ser efetuada de várias formas, no entanto, a estratégia mais promissora são os vetores virais que conseguem ultrapassar a barreira hematoencefálica, como os vírus adeno-associados (AAV). Há no entanto, várias limitações a ultrapassar, como por exemplo, a baixa capacidade de carga destes vetores virais. Uma das abordagens para contornar esta limitação passa pela utilização de uma Cas9 mais pequena, por exemplo, a Cas9 derivada do *Streptococcus aureus*, que é mais facilmente incorporada, e fornece portanto, uma melhor estratégia quando se trata de edição *in vivo*, no cérebro (Heidenreich e Zhang, 2015). Além disto, a entrega, separadamente, do RNA guia e da Cas9, em diferentes AAVs (Swiech *et al.*, 2015) ou então, a utilização de animais geneticamente modificados que expressem por si a Cas9 (ex: murganhos) são outras estratégias (Randall *et al.*, 2016).

7. Conclusão

A nossa perceção de como o genoma pode impactar no fenótipo, na fisiologia normal e na fisiopatologia de doenças neurológicas é ainda diminuto, muito devido à falta de ferramentas capazes de manipular geneticamente e de forma simples diferentes espécies animais, incluindo animais maiores, que quando comparados com os roedores, apresentam um desenvolvimento cerebral mais equiparável e alvo de transposição para o homem, permitindo assim estudos *in vivo* com maior relevância. Desta forma, um sistema simples, maioritariamente constituído por dois componentes, que se baseia no emparelhamento de bases por complementaridade, em que um RNA guia a nuclease à sequência de interesse no genoma constitui uma ferramenta revolucionária que estimulou inúmeras aplicações na ciência, nomeadamente, nas neurociências, no que concerne à produção de bons modelos animais para o estudo de patologias neurológicas (Barrangou e Doudna, 2016; Doudna e Charpentier, 2014). Além disto, o sistema CRISPR foi um avanço importante na produção de modelos celulares, em particular com linhas celulares humanas, contribuindo para a geração de linhas de células estaminais pluripotentes induzidas isogénicas, com o mesmo background genético, o que elimina a componente da intervariabilidade do homem, permitindo conclusões mais exatas (Grobarczyk *et al.*, 2015; Heidenreich e Zhang, 2015).

Por tudo isto, torna-se facilmente compreensível que a edição genética com a CRISPR permite gerar melhores modelos de doenças humanas, nomeadamente, doenças do cérebro, que permanecem objeto de dificuldades. Isto por sua vez, capacita a investigação farmacêutica no que concerne aos estudos de previsão da segurança farmacológica, toxicidade aguda,

crónica, reprodutiva, bem como outros estudos não-clínicos fundamentais no screening de novas moléculas que possam melhorar o arsenal terapêutico na neurologia, bem como a qualidade de vida do doente (Fellmann *et al.*, 2017).

Apesar de tudo, existem inúmeros desafios à utilização da CRISPR, tais como os distintos mecanismos de reparação de DSBs e a sua frequência nos neurónios, precisamente pela baixa taxa de HDR nestas células pós-mitóticas, sendo necessárias abordagens para aumentar a sua frequência. Por outro lado, para alcançar o sistema nervoso central há a necessidade de melhorar os mecanismos de vectorização ao cérebro, tendo em conta a barreira hematoencefálica (Holkers *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2016). Finalmente, permanece a preocupação com o potencial de corte fora do alvo de interesse ou ainda o mosaicismo.

Em suma, partindo do misterioso sistema imunitário procariótico desenvolveu-se uma das mais promissoras ferramentas para a comunidade científica que se espera que contribua de forma determinante para o avanço do conhecimento e terapias das doenças do cérebro (Hsu, Lander e Zhang, 2014).

Referências Bibliográficas

BARRANGOU, Rodolphe; DOUDNA, Jennifer A. - Applications of CRISPR technologies in research and beyond. **Nature Biotechnology**. . ISSN 1087-0156. 34:9 (2016) 933–941. doi: 10.1038/nbt.3659.

BOLOTIN, Alexander *et al.* - Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology**. . ISSN 13500872. 151:8 (2005) 2551–2561. doi: 10.1099/mic.0.28048-0.

BRENNAND, K. *et al.* - Modeling schizophrenia using hiPSC neurons Kristen. **Nature**. . ISSN 0028-0836 (Print). 473:7346 (2011) 221–225. doi: 10.1038/nature09915.Modeling.

BROOKHOUSER, Nicholas *et al.* - May I Cut in? Gene Editing Approaches in Human Induced Pluripotent Stem Cells. **Cells**. . ISSN 2073-4409. 6:1 (2017) 5. doi: 10.3390/cells6010005.

CHEN, Sidi *et al.* - Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. **Cell**. . ISSN 1097-4172 (Electronic). 160:6 (2016) 1246–1260. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.038.Genome-wide.

CHIRA, Sergiu *et al.* - CRISPR/Cas9: Transcending the Reality of Genome Editing. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**. . ISSN 21622531. 7:June (2017) 211–222. doi: 10.1016/j.omtn.2017.04.001.

CHO, Seung Woo *et al.* - Sup2. . ISSN 10889051. 2014) 132–141. doi: 10.1101/gr.162339.113.Freely.

CHOULIKA, André *et al.* - Induction of Homologous Recombination in Mammalian Chromosomes by Using the I-SceI System of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**. . ISSN 0270-7306. 15:4 (1995) 1968–1973. doi: 10.1128/MCB.15.4.1968.

CHU, Van Trung *et al.* - Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. **Nature Biotechnology**. . ISSN 1087-0156. 33:5 (2015) 543–548. doi: 10.1038/nbt.3198.

CONG, Le *et al.* - Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/VCas Systems. **Science**. . ISSN 15378276. 339:6121 (2013) 819–823. doi: 10.1126/science.1231143.Multiplex.

D'AGOSTINO, Ylenia; D'ANIELLO, Salvatore - Molecular basis, applications and challenges

of CRISPR/Cas9: a continuously evolving tool for genome editing. **Briefings in Functional Genomics**. . ISSN 2041-2649. 2017) elw038. doi: 10.1093/bfgp/elw038.

DING, Yuduan *et al.* - Recent Advances in Genome Editing Using CRISPR/Cas9. **Frontiers in plant science**. . ISSN 1664-462X. 7:May (2016) 703. doi: 10.3389/fpls.2016.00703.

DOETSCHMAN, Thomas; GEORGIEVA, Teodora - Gene Editing with CRISPR/Cas9 RNA-Directed Nuclease. **Circulation Research**. . ISSN 15244571. 120:5 (2017) 876–894. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309727.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. - The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**. . ISSN 0036-8075. 346:6213 (2014) 1258096–1258096. doi: 10.1126/science.1258096.

DOW, Lukas E. - Modeling Disease In Vivo With CRISPR/Cas9. **Trends in Molecular Medicine**. . ISSN 1471499X. 21:10 (2015) 609–621. doi: 10.1016/j.molmed.2015.07.006.

FELLMANN, Christof *et al.* - Cornerstones of CRISPR-Cas in drug discovery and therapy. **Nature reviews. Drug discovery**. . ISSN 1474-1784. 16:2 (2017) 89–100. doi: 10.1038/nrd.2016.238.

FU, Yanfang *et al.* - HHS Public Access. 32:3 (2014) 279–284. doi: 10.1038/nbt.2808.Improving.

GAJ, Thomas; GERSBACH, Charles A.; BARBAS, Carlos F. - ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Trends in Biotechnology**. . ISSN 01677799. 31:7 (2013) 397–405. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004.

GORI, Jennifer L. *et al.* - Delivery and Specificity of CRISPR-Cas9 Genome Editing Technologies for Human Gene Therapy. **Human gene therapy**. . ISSN 1557-7422 (Electronic). 26:7 (2015) 443–451. doi: 10.1089/hum.2015.074.

GROBARCZYK, Benjamin *et al.* - Generation of Isogenic Human iPS Cell Line Precisely Corrected by Genome Editing Using the CRISPR/Cas9 System. **Stem Cell Reviews and Reports**. . ISSN 15586804. 11:5 (2015) 774–787. doi: 10.1007/s12015-015-9600-1.

GUHA, Tuhin Kumar; WAI, Alvan; HAUSNER, Georg - Programmable Genome Editing Tools and their Regulation for Efficient Genome Engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**. . ISSN 20010370. 15:2017) 146–160. doi: 10.1016/j.csbj.2016.12.006.

HAFT, Daniel H. *et al.* - A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple

CRISPR/cas subtypes exist in prokaryotic genomes. **PLoS Computational Biology**. . ISSN 1553734X. 1:6 (2005) 0474–0483. doi: 10.1371/journal.pcbi.0010060.

HAY, Elizabeth A. *et al.* - Using the CRISPR/Cas9 system to understand neuropeptide biology and regulation. **Neuropeptides**. . ISSN 15322785. 2016). doi: 10.1016/j.npep.2016.11.010.

HEIDENREICH, Matthias; ZHANG, Feng - Applications of CRISPR–Cas systems in neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**. . ISSN 1471-003X. 17:1 (2015) 36–44. doi: 10.1038/nrn.2015.2.

HELER, Robert; MARRAFFINI, Luciano A.; BIKARD, David - Adapting to new threats: The generation of memory by CRISPR-Cas immune systems. **Molecular Microbiology**. . ISSN 13652958. 93:1 (2014) 1–9. doi: 10.1111/mmi.12640.

HOSSINI, Amir M. *et al.* - Induced pluripotent stem cell-derived neuronal cells from a sporadic Alzheimer’s disease donor as a model for investigating AD-associated gene regulatory networks. **BMC Genomics**. . ISSN 1471-2164. 16:1 (2015) 84. doi: 10.1186/s12864-015-1262-5.

HSU, Patrick D. *et al.* - DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. **Nature biotechnology**. . ISSN 1546-1696. 31:9 (2013) 827–32. doi: 10.1038/nbt.2647.

HSU, Patrick D.; LANDER, Eric S.; ZHANG, Feng - Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. **Cell**. . ISSN 10974172. 157:6 (2014) 1262–1278. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.010.

JACOBI, Ashley M. *et al.* - Simplified CRISPR tools for efficient genome editing and streamlined protocols for their delivery into mammalian cells and mouse zygotes. **Methods**. . ISSN 10959130. 121–122:2017) 16–28. doi: 10.1016/j.ymeth.2017.03.021.

JENNINGS, Charles G. *et al.* - Opportunities and challenges in modeling human brain disorders in transgenic primates. **Nature neuroscience**. . ISSN 1546-1726. 19:9 (2016) 1123–30. doi: 10.1038/nn.4362.

JIANG, Fuguo; DOUDNA, Jennifer A. - The structural biology of CRISPR-Cas systems. **Current Opinion in Structural Biology**. . ISSN 1879033X. 30:2015) 100–111. doi: 10.1016/j.sbi.2015.02.002.

JINEK, Martin *et al.* - A Programmable Dual-RNA – Guided. . ISSN 0036-8075. 337:August (2012) 816–822. doi: 10.1126/science.1225829.

JINEK, Martin *et al.* - RNA-programmed genome editing in human cells. **eLife**. . ISSN 2050084X. 2013:2 (2013) 1–9. doi: 10.7554/eLife.00471.

JINEK, Martin *et al.* - Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. **Science (New York, N.Y.)**. . ISSN 1095-9203. 343:6176 (2014) 1247997. doi: 10.1126/science.1247997.

KIM, Sojung *et al.* - Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. . ISSN 15495469. 2014) 1012–1019. doi: 10.1101/gr.171322.113.

LEE, Han B. *et al.* - Genome engineering with TALE and CRISPR systems in neuroscience. **Frontiers in Genetics**. . ISSN 16648021. 7:APR (2016) 1–24. doi: 10.3389/fgene.2016.00047.

LIU, Edison T. *et al.* - Of mice and CRISPR. **EMBO reports**. . ISSN 1469-221X. 2017) e201643717. doi: 10.15252/embr.201643717.

LIU, Kaiwen Ivy *et al.* - A chemical-inducible CRISPR-Cas9 system for rapid control of genome editing. **Nature chemical biology**. . ISSN 1552-4469. 12:11 (2016) 980–987. doi: 10.1038/nchembio.2179.

LO, Albert; QI, Lei - Genetic and epigenetic control of gene expression by CRISPR–Cas systems. **F1000Research**. . ISSN 2046-1402. 6:May (2017) 747. doi: 10.12688/f1000research.11113.1.

MAKAROVA, Kira S. *et al.* - A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. **Biology direct**. . ISSN 1745-6150. 1:1 (2006) 7. doi: 10.1186/1745-6150-1-7.

MAKAROVA, Kira S. *et al.* - An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. **Nature reviews. Microbiology**. . ISSN 1740-1534. 13:11 (2015) 722–736. doi: 10.1038/nrmicro3569.

MAKAROVA, Kira S.; ZHANG, Feng; KOONIN, Eugene V. - SnapShot: Class 2 CRISPR-Cas Systems. **Cell**. . ISSN 10974172. 168:1–2 (2017) 328–328.e1. doi: 10.1016/j.cell.2016.12.038.

MALI, Prashant; ESVELT, Kevin M.; CHURCH, George M. - Cas9 as a versatile tool for engineering biology. **Nature Methods**. . ISSN 1548-7091. 10:10 (2013) 957–963. doi: 10.1038/nmeth.2649.

MOUT, Rubul *et al.* - In Vivo Delivery of CRISPR/Cas9 for Therapeutic Gene Editing: Progress and Challenges. **Bioconjugate Chemistry**. . ISSN 15204812. 28:4 (2017) 880–884. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00057.

NELSON, Christopher E.; GERSBACH, Charles A. - Engineering Delivery Vehicles for Genome Editing. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**. . ISSN 1947-5438. 7:1 (2016) annurev-chembioeng-080615-034711. doi: 10.1146/annurev-chembioeng-080615-034711.

NEMUDRYI, A. A. *et al.* - TALEN and CRISPR / Cas Genome Editing Systems : Tools of Discovery. **Acta Naturae**. . ISSN 2075-8251. 6:22 (2014) 19–40. doi: 10.1007/s11103-014-0188-7.

NISHIMASU, Hiroshi *et al.* - Crystal Structure of Staphylococcus aureus Cas9 Supplemental Information. **Cell**. . ISSN 10974172. 162:5 (2015) 1113–1126. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.007.

NISHIMASU, Hiroshi *et al.* - HHS Public Access. 156:5 (2015) 935–949. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001.Crystal.

POWELL, S. K. *et al.* - Application of CRISPR/Cas9 to the study of brain development and neuropsychiatric disease. **Molecular and Cellular Neuroscience**. . ISSN 10959327. 82:2017) 157–166. doi: 10.1016/j.mcn.2017.05.007.

RAN, Fa Ann *et al.* - Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature protocols**. . ISSN 1750-2799. 8:11 (2013) 2281–2308. doi: 10.1038/nprot.2013.143.Genome.

RANDALL, J. *et al.* - Accessed HHS Public Access. 159:2 (2016) 440–455. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.014.CRISPR-Cas9.

SANDER, Jeffrey D.; JOUNG, J.Keith - CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. **Nature biotechnology**. . ISSN 1546-1696. 32:4 (2014) 347–55. doi: 10.1038/nbt.2842.

SHAH, Sa *et al.* - Protospacer recognition motifs. **RNA biology**. . ISSN 1547-6286. 10:May (2013) 891–899. doi: 10.4161/rna.23764.

SHUI, Bing *et al.* - The Rise of CRISPR/Cas for Genome Editing in Stem Cells. **Stem Cells International**. . ISSN 16879678. 2016:2016). doi: 10.1155/2016/8140168.

SMITH, Julianne *et al.* - A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. **Nucleic Acids Research**. . ISSN 03051048. 34:22 (2006) 1–12.

doi: 10.1093/nar/gkl720.

SOLDNER, Frank *et al.* - Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. **Cell**. . ISSN 0092-8674. 136:5 (2009) 964–977. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.013.Parkinson.

STANKIEWICZ, Paweł; LUPSKI, James R. - DISORDERS. C (1865) 187.

STERNBERG, Samuel H. *et al.* - Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR-Cas9. **Nature**. . ISSN 1476-4687. 527:7576 (2015) 1–14. doi: 10.1038/nature15544.

SWIECH, Lukasz *et al.* - HHS Public Access. 33:1 (2015) 102–106. doi: 10.1038/nbt.3055.In.

TAI, Derek J. C. *et al.* - HHS Public Access. 19:3 (2016) 517–522. doi: 10.1038/nn.4235.Engineering.

TU, Zhuchi *et al.* - CRISPR/Cas9: a powerful genetic engineering tool for establishing large animal models of neurodegenerative diseases. **Molecular neurodegeneration**. . ISSN 1750-1326. 10:2015) 35. doi: 10.1186/s13024-015-0031-x.

WANG, Xianlong *et al.* - One-step generation of triple gene- targeted pigs using CRISPR/Cas9 system. **Scientific reports**. . ISSN 2045-2322. October 2015 (2016) 1–7. doi: 10.1038/srep20620.

WRIGHT, Addison V.; NUÑEZ, James K.; DOUDNA, Jennifer A. - Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering. **Cell**. . ISSN 10974172. 164:1–2 (2016) 29–44. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.035.

WU, Yuxuan *et al.* - Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. **Cell Stem Cell**. . ISSN 19345909. 13:6 (2013) 659–662. doi: 10.1016/j.stem.2013.10.016.

WYKES, R. C.; LIGNANI, G. - Gene therapy and editing: Novel potential treatments for neuronal channelopathies. **Neuropharmacology**. . ISSN 18737064. 2017). doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.05.029.

XIONG, Xin *et al.* - CRISPR/Cas9 for Human Genome Engineering and Disease Research. **Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.** . ISSN 1545293X. 17:May (2016) 131–54. doi: 10.1146/annurev-genom-083115-022258.

YANG, Marty G.; WEST, Anne E. - Editing the neuronal genome: A CRISPR view of chromatin regulation in neuronal development, function, and plasticity. **Yale Journal of Biology and Medicine**. . ISSN 00440086. 89:4 (2016) 457–470.

YU, Xin *et al.* - Improved delivery of Cas9 protein/gRNA complexes using lipofectamine CRISPRMAX. **Biotechnology Letters**. . ISSN 15736776. 38:6 (2016) 919–929. doi: 10.1007/s10529-016-2064-9.

ZUO, Erwei *et al.* - One-step generation of complete gene knockout mice and monkeys by CRISPR/Cas9-mediated gene editing with multiple sgRNAs. **Cell Research**. . ISSN 1001-0602. March (2017) 1–13. doi: 10.1038/cr.2017.81.

ANEXOS

Anexo I I

Caraterísticas das ferramentas de edição genética: ZFNs; TALENs; CRISPR-Cas9

	ZFNs	TALENs	CRISPR-Cas9
Reconhecimento do alvo	Proteína-DNA	Proteína-DNA	RNA-DNA
Componentes - chave	ZF – Fok I	TALE – Fok I	RNA guia e Cas 9
Mecanismo	O domínio ZF é responsável pelo reconhecimento das sequências de DNA – Dimerização das nucleases Fok I e dupla clivagem da cadeia de DNA – Esta quebra dupla será reparada por NHEJ ou HDR.	O domínio TALE é responsável pelo reconhecimento das sequências de DNA – Dimerização das nucleases Fok I e dupla clivagem da cadeia de DNA – Esta quebra dupla será reparada por NHEJ ou HDR.	O RNA guia é responsável pelo emparelhamento com o DNA-alvo, próximo à sequência PAM (NGG) – Cas 9 cliva a dupla cadeia de DNA -- Esta quebra dupla será reparada por NHEJ ou HDR.
Vantagens	Eficiência e especificidade	Eficiência e especificidade	Alta eficiência, facilidade de construção e alteração de alvo, capacidade de multiplexing
Desvantagens	Consumo de tempo, Metodologia dispendiosa, Transposição de escala limitada pelo design, síntese e validação proteica.	Consumo de tempo, Metodologia dispendiosa, Transposição de escala limitada pelo design, síntese e validação proteica.	Exigência do motivo PAM; Tamanho da Cas9 elevado para entrega nos vetores AAV;
Multiplexing	Não	Não	Sim

ZFNs- nucleases dedo de zinco; **TALENs-** nucleases transcripção ativador-like-effectors **CRISPR-** clustered regularly interspaced short palindromic repeats **NHEJ-** União das extremidades não-homólogas; **HDR-** Recombinação Homóloga

Anexo I 2

Exemplos de utilização da CRISPR como ferramenta para produção de modelos de doenças neurológicas em células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs)- Modelos Celulares.

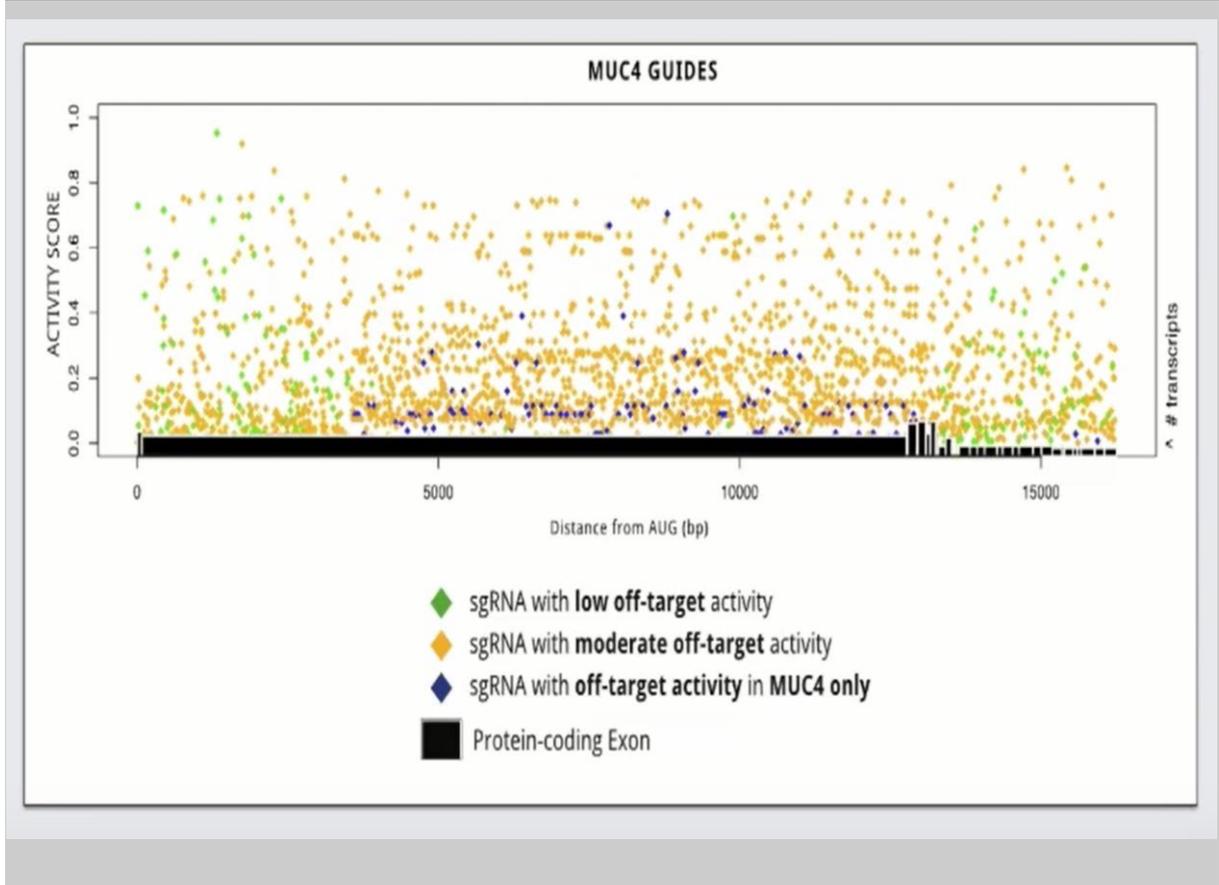
Doença Neurológica	Gene ou Cromossoma Alvo	Mutação via CRISPR	Referência
Autismo	CHD8	<i>Knock-out</i> (heterozigótico)	WANG et al., 2015
Huntington	HTT	Inserção de 97 repetições CAG no exão 1	MC et al., 2014

Doença mental major	DISC1	Frameshift no exão 2 (homozigótico) e no exão 8 (homo e heterozigótico)	SRIKANTH et al., 2015
Síndrome do X frágil	FMR1	Deleção das repetições CGG no 5'-UTR do gene FMR	PARK et al., 2015

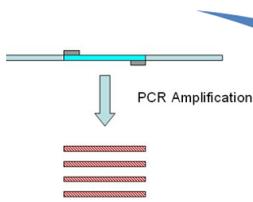
Anexo I3

Exemplos de ferramentas bioinformáticas para realizar o design do sgRNA, tenho em consideração o potencial de clivagem fora do sítio (off-target).

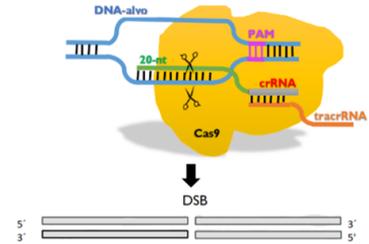
Plataforma	Link	Referência
CRISPR Design	http://crispr.mit.edu/	HSU et al., 2013
E-CRISP	http://www.e-crisp.org/E-CRISP/	HEIGWER et al., 2014
CRISPR multiTargeter	http://www.multicrispr.net/basic_input.html	PRYSKHOZHY et al., 2015
sgRNA Designer: CRISPRko	http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design	DOENCH et al., 2016
CCTop	http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/index.html	STEMMER et al., 2015
CHOPCHOP	http://chopchop.cbu.uib.no/index.php	LABUN et al., 2016



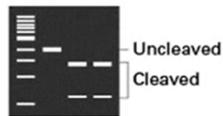
1. Usar PCR para gerar o alvo de interesse para a clivagem



2. Proceder à clivagem *in vitro* da sequência-alvo com os sgRNA sintetizados



3. Separar os fragmentos de clivagem em gel de agarose.



Anexo 14

Estratégia para testar a especificidade do sgRNA *in vitro*.