



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Rita Lopes Fernandes

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Sistema CRISPR/Cas9: Uma Abordagem Terapêutica Inovadora no Tratamento de Patologias Humanas” referentes à Unidade Curricular “Estágio” sob orientação da Dra. Dália Isabel Reis Gonçalves, do Dr. João Gabriel dos Santos Pinto Pimentel e do Professor Doutor Sérgio Paulo Magalhães Simões apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro de 2020



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Ana Rita Lopes Fernandes

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Sistema CRISPR/Cas9: Uma Abordagem Terapêutica Inovadora no Tratamento de Patologias Humanas” referentes à Unidade Curricular “Estágio” sob orientação da Dra. Dália Isabel Reis Gonçalves, do Dr. João Gabriel dos Santos Pinto Pimentel e do Professor Doutor Sérgio Paulo Magalhães Simões apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

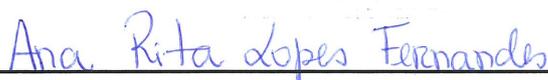
Outubro de 2020

DECLARAÇÃO DE HONRA

Eu, Ana Rita Lopes Fernandes, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2015249342, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Sistema CRISPR/Cas9: Uma Abordagem Terapêutica Inovadora no Tratamento de Patologias Humanas” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 28 de outubro de 2020,



(Ana Rita Lopes Fernandes)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Sérgio Paulo Magalhães Simões pela orientação e tempo dispensado na colaboração da realização da minha monografia.

Aos colaboradores da equipa do Departamento da Garantia da Qualidade da Farmalabor, por todo o apoio e incentivo, e por serem um exemplo de união e espírito de equipa.

À equipa da Farmácia Adriana pelos ensinamentos e amizades que construí durante o meu estágio.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por me ter acolhido nestes últimos 5 anos.

À Phartuna – Tuna de Farmácia de Coimbra pelos excelentes momentos, pelo espírito de companheirismo, e pelos desafios que contribuíram para a minha construção pessoal.

A Coimbra, por todos os momentos vividos e por todas as amizades que aqui construí.

Aos meus pais pelo apoio incondicional e por estarem sempre presentes em todos os momentos. Sem eles, a concretização desta etapa não teria sido possível.

A todos, o meu sincero OBRIGADO!

ÍNDICE

CAPÍTULO I - Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

LISTA DE ABREVIATURAS	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. GRUPO MEDINFAR	8
3. FARMALABOR – PRODUTOS FARMACÊUTICOS, S. A.	9
3.1. Departamento da Garantia da Qualidade (GQ).....	10
4. ANÁLISE SWOT	11
4.1 Pontos Fortes	12
Acolhimento, integração e formação inicial.....	12
Conhecimentos adquiridos.....	12
Autonomia.....	14
Boa relação com a equipa e bom ambiente de trabalho.....	14
Departamento multidisciplinar.....	14
4.2 Pontos Fracos	15
Duração do estágio.....	15
Pouco contacto com os restantes departamentos	15
4.3 Oportunidades	16
Crescimento e expansão da empresa	16
Conhecimento, na prática, e gestão da Sala de Retenção de Amostras	16
4.4 Ameaças.....	17
COVID-19.....	17
Dificuldade em aplicar, na prática, os conhecimentos adquiridos em algumas unidades curriculares do MICF.....	17
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	17

CAPÍTULO II - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

LISTA DE ABREVIATURAS	21
1. INTRODUÇÃO	22
2. FARMÁCIA ADRIANA.....	22
3. ANÁLISE SWOT	23
3.1. Pontos Fortes	23
Equipa técnica	23
Plano de estágio	24
Diversidade de tarefas.....	24
Gestão Comercial	24
3.2. Pontos Fracos	25
Impossibilidade de Preparação de Medicamentos Manipulados	25
Localização da Farmácia.....	26
Impossibilidade de avaliar os parâmetros bioquímicos.....	26
3.3. Oportunidades	27
Atendimento de público estrangeiro.....	27
Preparação Individualizada da Medicação (PIM)	27

3.4. Ameaças.....	27
COVID-19.....	27
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28

CAPÍTULO III – Monografia intitulada “Sistema CRISPR/Cas9: Uma Abordagem Terapêutica Inovadora no Tratamento de Patologias Humanas”

LISTA DE ABREVIATURAS	31
RESUMO.....	32
ABSTRACT	32
1. INTRODUÇÃO	33
2. CLUSTERED REGULARLY INTERSPACED SHORT PALINDROMIC REPEATS (CRISPR).....	34
2.1. Origem.....	34
2.2. Estrutura do Locus CRISPR.....	35
2.3. Tipos de Sistemas CRISPR/Cas.....	36
3. SISTEMA CRISPR/CAS9	37
3.1. Mecanismo de Imunidade Adaptativa.....	37
3.2. Ferramenta de Edição do Genoma.....	39
3.3. Formulação – Entrega do Sistema CRISPR/Cas9 às células-alvo	42
4. APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS	45
4.1. Doenças genéticas	45
4.2. Infecções Virais.....	46
Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).....	46
Vírus da Hepatite B (HBV)	47
Papilomavírus Humano (HPV).....	48
4.3. Cancro	48
5. ÉTICA	49
6. CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

CAPÍTULO I

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Farmalabor – Produtos Farmacêuticos, S. A.

Condeixa-a-Nova

Garantia da Qualidade

Sob a orientação da Dra. Dália Isabel Reis Gonçalves



LISTA DE ABREVIATURAS

AIM - Autorização de Introdução no Mercado

AQL - Limite de Qualidade Aceitável (*Acceptance Quality Limit*)

BPL/GLP - Boas Práticas de Laboratório (*Good Laboratory Practice*)

CAPAs - Ações Corretivas e Preventivas (*Corrective and Preventive Actions*)

CMO - Organização de Fabrico sob Contrato (*Contract Manufacturing Organization*)

CQ - Controlo de Qualidade

DUL - Documento Único Laboratorial

FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

GMP - Boas Práticas de Fabrico (*Good Manufacturing Practice*)

GQ - Garantia da Qualidade

IF - Instruções de Fabrico

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

OOS - Fora das Especificações (*Out of Specification*)

RQP/PQR - Revisão da Qualidade do Produto (*Product Quality Review*)

SWOT - *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

I. INTRODUÇÃO

O estágio curricular realizado no âmbito do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), para além de ser uma componente obrigatória para a finalização da formação académica de um farmacêutico, constitui também um primeiro contacto com aquela que poderá ser a minha futura atividade profissional.

A decisão de realizar o meu estágio em Indústria Farmacêutica deveu-se, não só, ao facto de a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) possibilitar a realização de estágios nesta área, o que representa uma mais-valia, mas sobretudo pelo meu interesse e curiosidade em contactar com esta disciplina profissional. Desde cedo que era da minha vontade ter uma melhor perceção sobre o funcionamento e dinâmica de uma Indústria Farmacêutica, sendo que os conhecimentos adquiridos em algumas unidades curriculares me despertaram ainda mais o interesse pelo ciclo dos medicamentos, pelo mercado farmacêutico e pelas atividades a si inerentes.

O estágio foi realizado no Departamento da Garantia da Qualidade (GQ) da Farmalabor entre os dias 8 de janeiro de 2020 e 12 de março de 2020, sob a orientação da Dra. Dália Gonçalves.

O presente relatório compreende uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), que irá permitir analisar os Pontos Fortes e Fracos do estágio, bem como as Oportunidades e Ameaças detetadas.

2. GRUPO MEDINFAR

O grupo Medinfar é uma empresa farmacêutica portuguesa, atualmente líder nacional na categoria de Saúde do Consumidor e Dermatologia, e 3º maior no top 5 de empresas portuguesas. Foi fundado em 1970, estando a sua sede localizada em Venda Nova, Amadora, e a Unidade de Produção Industrial em Condeixa-a-Nova, Coimbra.

O grupo Medinfar, desde que foi fundado, tem como objetivo investigar, desenvolver e fabricar produtos farmacêuticos, cosméticos e suplementos alimentares, bem como distribuir e comercializar os mesmos. Além de produzir marcas próprias, produz e comercializa também produtos licenciados em parceria com as maiores empresas farmacêuticas mundiais, e aposta continuamente no desenvolvimento de produtos

inovadores e em novas áreas terapêuticas, o que lhe permite ser uma unidade de produção farmacêutica de referência a nível europeu.

A estratégia do grupo Medifar consiste em fazer chegar os cuidados de saúde de forma ética, segura e sustentável a todos, estratégia esta que assenta em quatro princípios orientadores: sustentabilidade, inovação, globalização e diversidade. Tendo como estratégia de negócio a internacionalização, o grupo Medifar tem vindo a expandir a sua atividade, comercializando atualmente os seus produtos em mais de 40 países, sendo que a criação de uma filial em Marrocos, em 2000, foi um marco importante para o sucesso desta estratégia.

Assim, o grupo Medifar assume um compromisso com a saúde ao empenhar-se continuamente na expansão internacional, ao assegurar a qualidade dos medicamentos produzidos, ao apostar na investigação e desenvolvimento de novos produtos, processos e metodologias analíticas, e ao investir na modernização tecnológica na área de produção.¹

3. FARMALABOR – PRODUTOS FARMACÊUTICOS, S. A.

O grupo Medifar reforçou a sua capacidade de produção quando, em 2001, procedeu à aquisição da Farmalabor, uma Unidade de Produção Industrial localizada em Condeixa-a-Nova, na qual são produzidos produtos farmacêuticos não-estéreis, cosméticos e suplementos alimentares, que incluem formas sólidas, nomeadamente comprimidos, cápsulas, *pellets* e pós, formas líquidas, que incluem soluções, suspensões, xaropes, ampolas bebíveis e champôs, e formas semi-sólidas, nas quais estão incluídos cremes, pomadas, géis, emulsões, loções, espumas, mousses, supositórios e sabonetes.

Ao seguir a estratégia do grupo Medifar, do qual faz parte, a Farmalabor tem investido em tecnologias de produção mais modernas e tem prestado serviços de produção a cada vez mais empresas, que depositam na Farmalabor a confiança na qualidade dos produtos fornecidos, o que se reflete no acentuado crescimento do negócio industrial que se tem verificado ao longo dos últimos anos.

A Farmalabor é, então, uma Organização de Fabrico sob Contrato (*Contract Manufacturing Organization*) (CMO) certificada de acordo com todos os requisitos dos referenciais normativos em vigor, nomeadamente da Qualidade, pela norma ISO 9001:2015, do Ambiente, pela norma ISO 14001:2015, e da Segurança e Saúde Ocupacional, pela norma ISO 45001:2018. Além disso, cumpre com rigor e dedicação as Boas Práticas de Fabrico (GMP) e as Boas Práticas de Laboratório (BPL), proporcionando, por isso, serviços de

excelência que satisfazem os seus clientes, e está focada na melhoria contínua da qualidade dos produtos e serviços prestados em todas as atividades realizadas na Farmalabor, através de um Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) consolidado.²

Assim, a Farmalabor mostra-se, hoje em dia, muito competitiva, graças ao investimento realizado na tecnologia, à aposta em colaboradores com a formação adequada e aos serviços dotados de qualidade que presta aos seus clientes.

3.1. Departamento da Garantia da Qualidade (GQ)

A GQ desempenha um papel fundamental na Indústria Farmacêutica ao garantir que os produtos e serviços fornecidos aos seus clientes cumprem com exigência e rigor os normas de qualidade exigidas, de forma a assegurar a máxima eficácia e segurança dos produtos, e também a satisfação dos seus clientes.

Visto ser tão importante garantir a qualidade dos produtos fornecidos, a Farmalabor tem com prioridade estratégica o estabelecimento de um SGQ que assenta na melhoria contínua de todas as atividades levadas a cabo na empresa que possam de algum modo afetar a qualidade dos produtos e serviços, e que assegura que todas as normas, legislações e requisitos são devidamente cumpridos. Por conseguinte, todos os produtos são fabricados de acordo com a regulamentação estabelecida, de modo a obter a qualidade requerida, o que significa que todos os produtos são preparados de acordo com as GMP, todas as análises são efetuadas de acordo com as BPL, e todos os lotes produzidos são testados de acordo com o registado na Autorização de Introdução no Mercado (AIM). O SGQ permite, então, apurar todas as atividades que possam colocar em causa a qualidade, prevenir possíveis erros e desvios e melhorar continuamente a eficiência das várias atividades de modo a garantir que a qualidade é alcançada.

Deste modo é possível entender a importância da GQ, uma vez que é responsável por diversas atividades, entre elas a Gestão de Validação de Processos, em que, através de vários protocolos estabelecidos, é assegurado que os produtos cumprem com as especificações previstas de forma a garantir a máxima qualidade e a minimização de possíveis riscos; a Gestão de Desvios e Não Conformidades, através da qual são investigadas alterações cuja ocorrência não era prevista, e são identificadas as causas raiz e as ações corretivas e preventivas (*Corrective and Preventive Actions*) (CAPAs) a implementar; o Controlo de Alterações, através do qual todas as alterações planeadas são analisadas no sentido de avaliar o seu impacto na qualidade do produto e no SGQ, de forma a assegurar

que a conformidade com a regulamentação se mantém, assim como a eficiência de todos os processos e a qualidade dos produtos; a Revisão da Qualidade do Produto (*Product Quality Review*) (RQP ou PQR), que consiste na revisão periódica do estado de qualidade de um produto, cujo objetivo é avaliar a consistência do processo de fabrico, bem como a necessidade de executar CAPAs; a Qualificação de Fornecedores, através da qual é assegurado que os produtos e serviços adquiridos satisfazem os requisitos estabelecidos, para que a qualidade, a eficácia e a segurança não sejam afetadas; a Gestão Documental, que compreende a elaboração, revisão, alteração e otimização de documentos, de forma a assegurar que a informação relativa a todas as atividades efetuadas está constantemente correta, atualizada e cumpre com os requisitos estabelecidos, para que a qualidade possa ser garantida.

4. ANÁLISE SWOT

Dimensão Interna	Pontos Fortes (<i>Strengths</i>)	Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>)
	<ul style="list-style-type: none"> • Acolhimento, integração e formação inicial. • Conhecimentos adquiridos. • Autonomia. • Boa relação com a equipa e bom ambiente de trabalho. • Departamento multidisciplinar. 	<ul style="list-style-type: none"> • Duração do estágio. • Pouco contacto com os restantes departamentos.
Dimensão Externa	Oportunidades (<i>Opportunities</i>)	Ameaças (<i>Threats</i>)
	<ul style="list-style-type: none"> • Crescimento e expansão da empresa. • Conhecimento, na prática, e gestão da sala de Retenção de Amostras. 	<ul style="list-style-type: none"> • COVID-19. • Dificuldade em aplicar, na prática, os conhecimentos adquiridos em algumas unidades curriculares do MICE.

Figura 1: Análise SWOT do Estágio em Indústria Farmacêutica.

4.1. Pontos Fortes

Acolhimento, integração e formação inicial

No primeiro dia de estágio fui recebida, com outros estagiários, pela Dra. Dália Gonçalves na Farmalabor para uma formação inicial, na qual nos foi apresentado o Grupo Medifar e a Farmalabor, a sua unidade industrial. Nesta formação foi também abordado o tema Ambiente, no qual ficámos a conhecer a política ambiental da empresa, bem como a forma sustentável como é feita a gestão de resíduos, tratamento de efluentes, contenção de derrames e a gestão de água e energia na esfera ambiente, com o propósito de preservar os recursos naturais e defender a natureza e o ambiente. Outro dos tópicos abordados foi Higiene e Segurança no Trabalho, que incluiu a apresentação da regulamentação específica e em vigor na empresa, e do plano de segurança interno, bem como a elucidação para a importância da conformidade com a política, procedimentos e boas práticas em segurança, e as consequências do seu incumprimento.

Após a reunião fui visitar os departamentos da empresa, onde tive a oportunidade de me apresentar e de ficar a conhecer alguns dos colaboradores que, ao mostrarem-se bastante recetivos, contribuíram também para uma boa integração. Na visita ao departamento da GQ, além de conhecer a equipa com que viria a colaborar durante o meu estágio, foram-me dadas a conhecer algumas das atividades desenvolvidas nesta área, bem como a estrutura organizacional. Ao visitar de forma breve o departamento do Controlo de Qualidade (CQ) adquiri algumas noções básicas sobre as atividades aqui realizadas, bem como a sua importância e interligação com os restantes departamentos. O departamento no qual passei a maior parte do tempo na primeira semana de estágio foi a Produção. Aqui tive a oportunidade de visitar a secção de Produção de Formas Sólidas, e de Formas Líquidas e Pastosas, onde pude observar brevemente a execução de alguns processos de fabrico, e visitei também a secção da Embalagem, tendo sido possível aperceber-me da interligação e importância da cooperação destes departamentos com os restantes da empresa.

Conhecimentos adquiridos

O meu estágio decorreu no departamento da GQ, onde tive a oportunidade de ficar a conhecer de forma detalhada algumas das atividades aqui efetuadas e colaborar na realização das mesmas, e onde me apercebi do quão abrangente é este departamento relativamente às restantes atividades efetuadas na Farmalabor, uma vez que, apesar de não

ter tido a oportunidade de integrar outros departamentos, passei a conhecer e a compreender algumas das atividades realizadas nos mesmos sem as observar na prática.

Inicialmente foram-me apresentados vários documentos, nomeadamente o Manual de Instalação Fabril ou Site Master File, que tive a oportunidade de ler e de utilizar como base para preencher o questionário “Self-information Questionnaire for Manufacturers and Suppliers of Drug Products” para suporte de uma auditoria documental de cliente, o que permitiu que ficasse a conhecer um pouco melhor a empresa e as suas instalações. Fiquei também a conhecer procedimentos transversais emitidos pela GQ e outros documentos internos da empresa, entre eles o RQP, o Documento Único Laboratorial (DUL) e as Instruções de Fabrico (IF) que, quando preenchidas, passam a denominar-se Registo de Lote. Após ficar mais familiarizada com estes documentos, tive a oportunidade de analisar, rever e atualizar parte deles. Além disso, colaborei na compilação de vários RQPs e na análise de informações inerentes à elaboração dos mesmos.

Durante o meu processo de aprendizagem fiquei também a conhecer o Limite de Qualidade Aceitável (*Acceptance Quality Limit*) (AQL), uma ferramenta que permite estabelecer critérios para aceitar ou rejeitar um lote de um determinado produto, garantindo a qualidade do mesmo. Após a produção de um lote de determinado medicamento, os atributos visuais são avaliados por lote e de acordo com a dimensão do mesmo, para verificar se a proporção de produto não conforme não ultrapassa os limites estabelecidos nas normas, sendo que para cada produto existe um AQL. Assim, uma das atividades que me foi atribuída foi analisar o documento associado ao AQL, bem como entregar ao departamento da Produção os selos de expedição acompanhados da devida *Checklist* da expedição do produto intermédio acabado quando os lotes produzidos são destinados a empresas que requisitaram os serviços de produção da Farmalabor.

Outra das tarefas que tive a oportunidade de realizar foi o levantamento de histórico de suporte às investigações, que eram efetuadas com o intuito de investigar ocorrências ou resultados fora das especificações (*Out of Specification*) (OOS) que surgiam ao longo do processo de produção. Deste modo, recolhi e analisei Registos de Lote de vários produtos que apresentavam desvios ao AQL ou OOS, de forma a detetar variações no processo entre os vários lotes fabricados, permitindo, assim, identificar possíveis causas raiz para os desvios ou OOS.

Autonomia

Desde o início do meu estágio que tive sempre bastante apoio por parte de toda a equipa da GQ, que se disponibilizou para me explicar tudo o que era necessário para desempenhar as minhas funções o melhor possível. Além disso, foi-me concedido um espaço de trabalho equipado com um computador para exercer as minhas tarefas e fui integrada no Sistema Informático da empresa, o que possibilitou que o meu trabalho fosse realizado de forma autónoma. Assim, considero que o estágio, ao ser maioritariamente prático e pouco observacional, foi bastante proveitoso, pois deu-me mais confiança no trabalho que estava a realizar, estimulou o meu espírito crítico e fez-me sentir mais responsável pelas atividades que me eram solicitadas.

Boa relação com a equipa e bom ambiente de trabalho

Durante todo o meu estágio fui bem recebida e acolhida por todos os colaboradores da empresa, em especial pela equipa que integra a GQ. Toda a equipa se mostrou sempre disposta a ajudar, tanto na explicação de conceitos e tarefas relacionados com as minhas funções como estagiária, como no esclarecimento de qualquer dúvida que surgisse durante a execução das mesmas. O espírito de equipa e entreatajuda, a cooperação, a dedicação e o bom ambiente de trabalho fizeram-me sentir bem integrada e contribuíram para uma aprendizagem dinâmica e favorável.

Departamento multidisciplinar

Ao realizar o meu estágio no departamento da GQ pude constatar que este é um departamento multidisciplinar, composto por uma equipa de colaboradores com variadas formações de base, como Engenharia Química, Biologia e Ciências Farmacêuticas, que trabalham em colaboração permanente com os outros departamentos da empresa, sendo fundamental o papel desempenhado pela GQ ao longo de todas as atividades que o ciclo do medicamento engloba para que o desempenho global da empresa seja o melhor possível. Assim, estagiar no departamento da GQ proporcionou-me uma visão geral das atividades desenvolvidas nos restantes departamentos da empresa, e também a compreensão do quão importante é a cooperação e interligação entre os vários departamentos de forma a garantir a excelência e a qualidade do trabalho realizado.

4.2. Pontos Fracos

Duração do estágio

O estágio curricular realizado numa área que não a Farmácia Comunitária ou Farmácia Hospitalar é apenas proporcionado pela FFUC, representando, portanto, uma vantagem que nos diferencia dos restantes futuros farmacêuticos. Porém, o estágio realizado em Indústria Farmacêutica tem a duração de 3 meses e, apesar de parecer um período de tempo suficiente, considero que poderia ser proveitoso se fosse mais extenso, no sentido em que poderia dar-me a oportunidade de contactar um pouco mais com outros departamentos da empresa e não só com a GQ, além de ganhar ainda mais autonomia e conhecimento de outros temas trabalhados na GQ.

Durante o período de estágio tenho a percepção de que adquiri conhecimentos mais aprofundados e autonomia em diversas funções, o que apenas foi possível porque o estágio foi maioritariamente na área da GQ. No entanto, gostaria de ter tido mais contacto com outros departamentos, pois tenho a noção de que teria sido vantajoso conhecer melhor toda a realidade, funcionamento e organização de uma IF, o que apenas poderia ser possível se o estágio tivesse uma duração mais longa.

Pouco contacto com os restantes departamentos

No início do estágio tive a oportunidade de conhecer vários departamentos da Farmalabor para além da GQ, nomeadamente a Produção e Embalagem e o CQ, mas não tive a oportunidade de visitar o departamento da Logística e Armazém. Além disso, a interação com alguns departamentos foi mais reduzida, tendo ocorrido apenas de forma indireta durante a realização de algumas investigações e compilação de documentos.

Compreendo que de outra forma não seria possível adquirir conhecimentos tão aprofundados como aqueles que adquiri ao ter o meu estágio focado na área da GQ, mas gostaria de ter contactado um pouco mais com os outros departamentos, uma vez que poderia compreender melhor a interligação e cooperação necessárias entre os mesmos para assegurar o bom funcionamento de todo o processo de fabrico de um medicamento, além de poder também observar na prática muitos dos conceitos e atividades descritos nos documentos gerados no departamento da GQ.

4.3. Oportunidades

Crescimento e expansão da empresa

A Farmalabor tem vindo a reforçar continuamente o desenvolvimento tecnológico e a inovação, promovendo a sua expansão. Recentemente foi posto em prática um projeto de reformulação da área de produção de produtos farmacêuticos sólidos orais, com o objetivo de aumentar a capacidade e a competitividade operacional, através da otimização dos recursos e da adoção de tecnologias avançadas. Além disso, a Farmalabor irá em breve usufruir de um aumento do seu espaço de armazém, já em fase de movimento de terras, e há também um projeto para os próximos anos para a construção de um novo espaço destinado ao desenvolvimento e produção de novos produtos.

Assim, a Farmalabor, e também a Medinfar, mostram-se muito competitivas e abertas à inovação tecnológica, daí resultando o contínuo crescimento e expansão, o que poderá representar uma oportunidade para novos colaboradores, nomeadamente farmacêuticos recém-formados, como é o meu caso, de fazer parte desta empresa na sua futura carreira profissional.

Conhecimento, na prática, e gestão da Sala de Retenção de Amostras

Durante o meu estágio na Farmalabor tive a oportunidade de visitar mais do que uma vez a Sala de Retenção de Amostras existente na empresa, também conhecida como Farmacoteca, e de recolher amostras necessárias para análises e investigações que surgiram. Este espaço é de acesso restrito e nele são guardadas amostras representativas dos vários lotes de todos os medicamentos produzidos, sob condições específicas que permitam a conservação dos mesmos durante todo o tempo de vida útil do medicamento. Estas amostras são aqui mantidas com a finalidade de realizar análises que sejam requeridas para um lote de um determinado medicamento, mas também para consultar qualquer informação que possa vir a ser necessária durante o tempo de vida útil do medicamento.

Assim, considero que a visita à Sala de Retenção de Amostras foi bastante útil, uma vez que me permitiu conhecer a sua finalidade e, acima de tudo, a sua importância para a avaliação da qualidade e segurança do medicamento.

4.4. Ameaças

COVID-19

No dia 12 de março, cerca de uma semana após surgirem os primeiros casos de COVID-19 em Portugal, recebi a indicação, por parte da FFUC e da Farmalabor, da necessidade de cancelar o meu estágio, tendo ido nesse mesmo dia para casa, dando, por isso, o estágio por concluído. Assim sendo, considero que o COVID-19 representou uma ameaça para o meu estágio, já que me forçou a terminar o mesmo antes do previsto, numa fase em que já desempenhava as minhas principais funções com autonomia e rapidez.

Dificuldade em aplicar, na prática, os conhecimentos adquiridos em algumas unidades curriculares do MICF

Estagiar na Farmalabor deu-me a oportunidade de colocar em prática conhecimentos adquiridos em algumas unidades curriculares, tais como Assuntos Regulamentares e Gestão e Garantia da Qualidade. No entanto, considero que os conteúdos lecionados foram difíceis de ser aplicados no estágio, uma vez que transpor os conhecimentos teóricos adquiridos para a realidade que se vive na Indústria Farmacêutica é bastante complexo.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização do meu estágio curricular em IF deu-me a oportunidade de ter um primeiro contacto com esta área profissional que sempre me despertou bastante interesse, tendo-se revelado uma experiência bastante enriquecedora e desafiante. Considero, então, que foi uma mais-valia aproveitar a oportunidade que a Faculdade de Farmácia me proporcionou de forma a conhecer o papel preponderante do farmacêutico, como especialista do medicamento, na IF, tendo assim concluído que neste recaem grandes responsabilidades nos diversos setores, nomeadamente na GQ, que acompanhei com maior proximidade, para que o produto final seja obtido com a máxima segurança, eficácia e qualidade possível.

Apesar de o meu estágio ter decorrido apenas na área da GQ, sinto que me foi possível obter uma visão bastante alargada do funcionamento geral de uma IF. Além disso, adquiri bastantes conhecimentos e desenvolvi competências profissionais e pessoais, entre as quais a comunicação, o trabalho em equipa, o sentido de responsabilidade, a resolução de

problemas e a análise crítica, que muito se deveu à forma como fui integrada desde o primeiro dia e ao apoio constante recebido ao longo do meu estágio por parte de toda a equipa da GQ, em particular por parte da Dra. Dália Gonçalves, minha orientadora do estágio, e também da Eng^a. Áurea Ferreira, da Dra. Catarina Silva e da Dra. Daniela Oliveira.

Concluo que este estágio foi, sem dúvida, uma experiência gratificante quer a nível profissional quer a nível pessoal, tendo superado as minhas expectativas e contribuído certamente para o meu futuro como farmacêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MEDINFAR. – (Acedido a 14 de abril de 2020) Disponível em:
<https://www.medinfar.pt/pt>
2. FARMALABOR – Documento Institucional

CAPÍTULO II

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Adriana

Coimbra

Sob a orientação do Dr. João Gabriel dos Santos Pinto



LISTA DE ABREVIATURAS

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MM - Medicamentos Manipulados

PIM - Preparação individualizada da medicação

SWOT - *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

I. INTRODUÇÃO

O estágio curricular em farmácia comunitária representa o culminar de 5 anos de aprendizagem do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), sendo um dos primeiros contactos estabelecidos com a nossa futura realidade profissional.

Como agente de saúde pública e especialista do medicamento, o papel do farmacêutico na promoção da saúde é essencial, não só na minimização dos problemas e na melhoria do bem-estar dos utentes, mas também na promoção da informação e aconselhamento farmacoterapêutico.

Assim, é essencial a realização deste estágio curricular, de forma a consolidar e a colocar em prática os conhecimentos adquiridos ao longo do curso, ficar a conhecer as funções de um farmacêutico na farmácia de oficina para além da dispensa de medicamentos e aconselhamento, mas também de forma a promover o desenvolvimento de outras capacidades e competências essenciais para a formação de um futuro farmacêutico no contexto de Farmácia Comunitária, tais como a capacidade de comunicação e interação com o utente e com a equipa de trabalho, o trabalho em equipa e a resolução de problemas.

O estágio foi realizado na Farmácia Adriana, sob a orientação do Dr. João Pimentel, proprietário e Diretor Técnico da farmácia, de 5 de maio de 2020 a 31 de agosto de 2020, cuja duração total corresponde a 670 horas.

O presente relatório compreende uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), onde irei proceder à análise dos Pontos Fortes e Fracos, bem como as Oportunidades e Ameaças identificados ao longo do estágio.

2. FARMÁCIA ADRIANA

A Farmácia Adriana, localizada na Praça da República, é uma das farmácias mais antigas da cidade de Coimbra, contando com mais de 100 anos de história. É bastante agradável e acolhedora, apesar de o seu espaço ser reduzido, preservando uma decoração alusiva a uma farmácia mais antiga ao expor os seus produtos de venda livre em armários em vez de lineares, e ao exibir instrumentos antigos utilizados em diversas atividades farmacêuticas.

Estando situada num local de passagem de muitos visitantes da cidade de Coimbra, a Farmácia Adriana usufrui de clientes bastante variados, que vão desde os clientes habituais

que vivem ou trabalham perto da farmácia, aos turistas que visitam a cidade e aos estudantes que frequentam a Universidade de Coimbra.

3. ANÁLISE SWOT

	Pontos Fortes (<i>Strengths</i>)	Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>)
Dimensão Interna	<ul style="list-style-type: none"> • Equipa técnica. • Plano de estágio. • Diversidade de tarefas. • Gestão Comercial. 	<ul style="list-style-type: none"> • Impossibilidade de preparação de medicamentos manipulados. • Localização da Farmácia. • Impossibilidade de avaliar os parâmetros bioquímicos.
	Oportunidades (<i>Opportunities</i>)	Ameaças (<i>Threats</i>)
Dimensão Externa	<ul style="list-style-type: none"> • Atendimento de público estrangeiro. • Preparação Individualizada da Medicação (PIM). 	<ul style="list-style-type: none"> • COVID-19.

Figura 1: Análise SWOT do Estágio em Farmácia Comunitária.

3.1. Pontos Fortes

Equipa técnica

A equipa técnica da Farmácia Adriana é atualmente constituída pelo Dr. João Pimentel, Diretor-Técnico, pela Dra. Ângela Mota, Farmacêutica Substituta e pela Sra. Adélia Guerra, Técnica de Farmácia.

Considero que a minha adaptação na farmácia ocorreu rapidamente e da melhor forma possível, pois senti-me integrada desde o primeiro momento por parte de toda a equipa. Além disso, a equipa mostrou-se sempre disponível para esclarecer qualquer dúvida, permitindo, assim, um maior enriquecimento e uma maior consolidação dos meus conhecimentos.

O espírito de equipa e entreadajuda, a cooperação, a dedicação e o bom ambiente de trabalho fizeram-me sentir bem integrada e contribuíram para uma aprendizagem dinâmica e

favorável, portanto considero que a equipa foi fundamental para o meu processo de aprendizagem e evolução ao longo do estágio.

Plano de estágio

Desde o início do estágio que me foi atribuída bastante autonomia, o que me permitiu, desde logo, adquirir um forte sentido de responsabilidade nas tarefas a desempenhar. Numa fase inicial o estágio consistiu essencialmente em tarefas de *backoffice*, entre as quais destaco a receção de encomendas e posterior arrumação dos medicamentos nos locais adequados, gestão de *stocks* e realização e regularização de devoluções. Nesta fase tive também a oportunidade de assistir a alguns atendimentos, com a finalidade de me familiarizar com o método de atendimento e com o programa Sifarma 2000[®]. Rapidamente tive a oportunidade de efetuar o atendimento ao público, numa primeira fase acompanhada e, após estar preparada e segura, pude fazê-lo autonomamente, contando sempre com o apoio de toda a equipa para o esclarecimento de qualquer dúvida que surgisse. Deste modo, considero que a confiança em mim depositada contribuiu para me tornar mais autónoma e capaz.

Diversidade de tarefas

Um dos pontos fortes do meu estágio foi a diversidade de tarefas que pude aprender e realizar, e que contribuíram para a perceção da dinâmica de uma farmácia. Ao longo do estágio tive a oportunidade de colaborar com as atividades de *backoffice*, tais como a gestão de *stocks* e encomendas, arrumação de produtos, preparação individualizada da medicação, e realização e regularização de devoluções. Estas atividades permitiram-me alargar a visão sobre o funcionamento interno de uma farmácia e perceber a importância de cada uma delas. Assim, considero a diversidade de tarefas um ponto forte do meu estágio, já que não só facilitou a perceção da dinâmica de uma farmácia, como também me habilitou a desempenhar qualquer uma delas no meu futuro profissional, fazendo desta forma sentir-me mais preparada.

Gestão Comercial

A Farmácia Adriana integra um grupo de farmácias, o Grupo Coimbra, através do qual tem acesso a vantagens financeiras, entre as quais descontos na compra de determinados produtos do *stock* do grupo. Os grupos de compras fazem, então, parte do

modelo de gestão comercial de muitas farmácias atualmente, o que lhes permite obter margens maiores na compra e venda de determinados produtos.

Outra questão a ter em conta na gestão comercial de uma farmácia é a gestão do volume de compras dos produtos, de forma a não perder vendas por rutura de stocks e, por outro lado, não perder produtos devido ao prazo de validade expirado, por falta de vendas. Além disso, deve também ter-se em conta que, muitas das vezes, os reforços de stock originam volumes de compras maiores junto do laboratório ou armazenista, que se traduzem em melhores condições de compra para a farmácia, em formato de descontos ou bonificações.

Assim, considero que estar de certa forma envolvida na gestão comercial da farmácia foi um ponto positivo do meu estágio, pois mostrou-me que esta é uma atividade fundamental a ser exercida para garantir a rentabilidade da mesma.

3.2. Pontos Fracos

Impossibilidade de Preparação de Medicamentos Manipulados

Apesar de ser um serviço que integra a atividade farmacêutica, a preparação de medicamentos manipulados (MM) não é realizada na Farmácia Adriana. De facto, esta é uma prática farmacêutica cada vez menos desempenhada hoje em dia nas farmácias, uma vez que o crescimento significativo das indústrias farmacêuticas levou a um aumento da oferta de medicamentos no mercado e, conseqüentemente, a uma diminuição da prescrição de MM por parte dos médicos, sendo estes apenas prescritos caso não existam alternativas no mercado para a terapêutica em causa. Assim, este serviço acaba por ser pouco procurado pelos utentes das farmácias e, ainda que a Farmácia Adriana possua um espaço adequado e que reúne as condições exigidas para a preparação de MM, este serviço não é atualmente prestado, pois a aquisição das matérias-primas necessárias acaba por ser muito dispendiosa para a farmácia, já que as mesmas não são utilizadas, e o seu prazo de validade é relativamente limitado tendo em conta a reduzida procura deste serviço pelos utentes.

Considero, então, este aspeto como sendo um ponto fraco do meu estágio, uma vez que não tive oportunidade de contactar com esta valência da Farmácia Comunitária, o que julgo que seria importante para a minha formação, ainda que compreenda que no contexto da farmácia onde estagiei não faça sentido a realização deste serviço, uma vez que não é procurado pelos seus utentes.

Localização da Farmácia

A Farmácia Adriana está situada na Praça da República, uma zona de passagem e de grande movimento, sendo muito frequentada por turistas e estudantes, graças à sua proximidade com alguns pontos turísticos da cidade e com o Polo I da Universidade de Coimbra. Além disso, este local reúne principalmente espaços da área de restauração e bares, e concentra maioritariamente alojamentos locais em detrimento de habitações de carácter permanente, o que leva a seja frequentado maioritariamente por um público mais jovem e de passagem, o que acaba por ditar o público que frequenta a farmácia.

Tendo em conta que a população mais jovem não é o público-alvo de uma farmácia, o fluxo de utentes acaba por ser menor, dado que são poucas as pessoas mais idosas que se deslocam a esta zona. É ainda de referir a presença de outra farmácia a poucos metros da Farmácia Adriana, o que acaba também por ser um fator agravante no número de pessoas que se deslocam à farmácia diariamente.

Neste sentido, todos estes fatores têm um impacto negativo na afluência diária de utentes, o que acabou por limitar o meu estágio, pois impossibilitou o contacto com uma maior multiplicidade de situações, que seriam essenciais para novas aprendizagens e para colocar em prática os conhecimentos adquiridos.

Impossibilidade de avaliar os parâmetros bioquímicos

A avaliação dos parâmetros bioquímicos, tais como a glicémia, o colesterol e os triglicéridos, não é um serviço farmacêutico prestado atualmente na Farmácia Adriana, uma vez que este é um serviço pouco procurado pelos utentes da farmácia, além de implicar custos e obrigações legais que tornam a prestação do serviço desfavorável em termos de rentabilidade.

No entanto, penso que a prestação deste serviço teria sido uma mais-valia para o meu estágio, pois dessa forma poderia colocar em prática conhecimentos adquiridos e desenvolver o aconselhamento farmacêutico com o utente.

3.3. Oportunidades

Atendimento de público estrangeiro

Dada a sua localização ser próxima da Universidade de Coimbra e dos principais pontos turísticos da cidade, é bastante comum o atendimento de turistas e estudantes estrangeiros na Farmácia Adriana. Ainda que, devido ao COVID-19, a afluência de público internacional tenha sido muito inferior ao normal, uma vez que as aulas presenciais na Universidade de Coimbra foram canceladas até ao final do ano letivo, e a visita de turistas à cidade tenha diminuído drasticamente, tive a oportunidade de atender quase diariamente utentes estrangeiros.

Considero que esta situação foi bastante benéfica, visto que me permitiu praticar e melhorar a minha capacidade de comunicar em inglês. Além disso, por vezes eram-me solicitados medicamentos cujo nome comercial não existe em Portugal, tendo, por isso, de pesquisar a composição do medicamento em causa, de forma a descobrir um possível equivalente terapêutico, o que se revelou bastante desafiante.

Preparação Individualizada da Medicação (PIM)

Um serviço farmacêutico prestado pela Farmácia Adriana que tive a oportunidade de executar diversas vezes foi a PIM, que consiste na organização, de acordo com a posologia prescrita pelo médico, das formas farmacêuticas sólidas orais que o utente toma num dispositivo compartimentado de acordo com os dias da semana e os vários momentos do dia correspondentes ao horário em que a medicação deve ser administrada. Após os medicamentos serem reacondicionados no dispositivo, este é selado, e para auxiliar o utente a fazer a correta administração e promover a sua adesão à terapêutica, são registadas as informações referentes quer à medicação incluída quer à não incluída no dispositivo. Posto isto, penso que a PIM foi uma função que enriqueceu bastante o meu estágio.

3.4. Ameaças

COVID-19

A realização do estágio durante a situação de pandemia devido ao COVID-19 representou, sem dúvida, uma ameaça para o meu estágio. Além de ter feito com que este tivesse início apenas 1 mês após o previsto, uma vez que a data de início do meu estágio em

farmácia comunitária coincidiu com a fase de confinamento decretada pelo Governo, a situação pandémica levou ainda a uma diminuição drástica do número de utentes que se dirigiam diariamente à farmácia, uma vez que tanto os estudantes da Universidade como os turistas, principal público-alvo da Farmácia Adriana, não se encontravam em Coimbra. Perante este cenário, o número de atendimentos diminuiu de tal forma que a farmácia acabou por atravessar um período muito difícil a nível económico, que a forçou a recorrer ao regime de *lay-off*.

É também de referir que o conjunto de medidas de proteção implementadas na farmácia, nomeadamente a instalação de acrílicos no balcão de atendimento, aliada ao uso da máscara de proteção individual e à distância de segurança a manter dentro da farmácia, dificultaram a comunicação com o utente.

Por fim, uma vez que a atividade farmacêutica está associada a uma formação contínua e atualizada, de forma a garantir um aconselhamento mais completo e seguro aos utentes, é habitual os laboratórios promoverem formações acerca de produtos novos ou já existentes, sendo estas formações cruciais para adquirir novos conhecimentos, e complementar e aprofundar outros já adquiridos, de modo a proporcionar um atendimento o mais útil possível para o utente. A Farmácia Adriana dá a oportunidade aos seus estagiários de participar nestas formações mas, tendo em conta o cenário atual de pandemia, nenhuma delas se realizou durante o meu período de estágio. Ainda que não tenha sido possível frequentar nenhuma destas formações, pude participar em algumas que ocorreram *online*, o que considero que foi uma mais-valia em termos de aprendizagem.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo dos 5 anos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) pude adquirir conhecimentos e competências em diversas áreas, tendo o meu percurso culminado com o estágio em farmácia comunitária, na farmácia Adriana.

Para além de me ter dado a oportunidade de colocar em prática e consolidar os conhecimentos adquiridos, também proporcionou o desenvolvimento de outras competências igualmente importantes, tais como a comunicação, quer com a equipa quer com os utentes, sendo especialmente importante na transmissão de informação aos utentes, de forma a responder a todas as suas necessidades, o espírito crítico, a organização, o sentido de responsabilidade e a capacidade de resolução de problemas. Estou segura de que

estas competências foram fundamentais para complementar a minha formação como futura farmacêutica, o que muito se deveu à forma como fui acolhida e integrada pela equipa da Farmácia Adriana, a quem agradeço por todo o apoio, disponibilidade, amizade e ensinamentos transmitidos.

Por fim, concluo que este estágio foi, sem dúvida, uma experiência que se revelou uma mais-valia para o meu crescimento profissional e pessoal, e que me mostrou a importância que o farmacêutico tem na promoção da saúde, na Farmácia Comunitária.

CAPÍTULO III

Monografia

**“Sistema CRISPR/Cas9: Uma Abordagem Terapêutica
Inovadora no Tratamento de Patologias Humanas”**

Sob a orientação do Professor Doutor Sérgio Paulo de Magalhães Simões,

LISTA DE ABREVIATURAS

AAV - Vírus Adeno-Associados

AV - Adenovírus

CAR-T - *Chimeric Antigen Receptor-T*

cccDNA - *Covalently Closed Circular DNA*

CCR5 - *C-C chemokine receptor type-5*

CRISPR - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

crRNA - RNA CRISPR

DMD - Distrofia Muscular de Duchenne

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DSB - Quebra da dupla cadeia de DNA (*Double Stranded Break*)

HBV - Hepatite B

HDR - Reparação Direta por Homologia (*Homology Directed Repair*)

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

hPSCs - *Human Pluripotent Stem Cells*

HR - Recombinação Homóloga (*Homologous Recombination*)

LTRs - *Long Terminal Repeats*

LV - Lentivírus

MPS - Sistema de Fagócitos Mononucleares

NHEJ - União das Extremidades Não Homóloga (*Non Homolog End Joining*)

NUC - *Nuclease Lobe*

PAM - *Protospacer Adjacent Motif*

pré-crRNA - Percursor de RNA CRISPR

REC - *Recognition Lobe*

RNA - Ácido ribonucleico

RNase III - Ribonuclease III

SCD - *Sickle Cell Disease*

sgRNA - *Single guide RNA*

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SpCas9 - *Streptococcus pyogenes Cas9*

SRSR - *Short Regularly Spaced Repeats*

TALENs - *Transcription activator-like effectors*

tracrRNA - RNA CRISPR trans-ativador

ZFNs - *Zinc Finger Nucleases*

RESUMO

A descoberta de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR), um sistema de defesa adaptativo de bactérias contra infecções virais, permitiu a criação de uma tecnologia denominada sistema CRISPR/Cas9 que veio revolucionar as tecnologias de edição do genoma. Este sistema tem-se destacado devido à sua versatilidade, simplicidade e eficiência na manipulação genética. As investigações realizadas ao longo dos últimos anos têm vindo a comprovar a utilidade e o potencial desta tecnologia para aplicações terapêuticas, particularmente na terapia génica. O potencial do sistema CRISPR/Cas9 tem vindo a progredir graças ao conhecimento cada vez mais pormenorizado dos mecanismos deste sistema e das estratégias de edição do genoma utilizadas. Existem, no entanto, ainda muitos desafios que têm de ser superados para que esta tecnologia possa ser considerada segura e eficaz no tratamento de muitas patologias.

Palavras-chave: Tecnologia, CRISPR/Cas9, Edição do Genoma, Aplicações Terapêuticas, Terapia Génica, Desafios.

ABSTRACT

The discovery of *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR), an adaptive defence system for bacteria against viral infections, allowed the creation of a technology called CRISPR/Cas9 system that came to revolutionize genome editing technologies. This system has stood out due to its versatility, simplicity and efficiency in genetic manipulation. Research carried out over the past few years has proven the usefulness and potential of this technology for therapeutic applications, particularly in gene therapy. The potential of the CRISPR/Cas9 system has been progressing thanks to the increasingly detailed knowledge of the mechanisms of this system and the genome editing strategies used. However, there are still many challenges that have to be overcome in order for this technology to be considered safe and effective in the treatment of many pathologies.

Keywords: Technology, CRISPR/Cas9, Genome Editing, Therapeutic Applications, Gene Therapy, Challenges.

I. INTRODUÇÃO

Os avanços que têm vindo a ocorrer na área da biotecnologia e da engenharia genética permitiram aos cientistas desenvolver e aplicar novas estratégias e ferramentas na edição do genoma.^{1;2} A manipulação genética do DNA, quer seja através da inserção, exclusão ou substituição do mesmo em locais específicos do genoma, apresenta grande potencial para aplicações terapêuticas, quer seja na prevenção quer no tratamento de patologias.^{2; 3; 4; 5}

Inicialmente recorreu-se à Recombinação Homóloga (HR) para editar o genoma. Através desta técnica é possível inserir uma sequência de DNA exógeno homóloga à sequência alvo que se pretende modificar. Devido às suas limitações, nomeadamente a ineficiência em várias células e organismos eucariotas e à possibilidade de ocorrência de mutações, esta técnica não é largamente aplicada.^{3; 6}

O progresso ocorrido nos últimos anos levou ao estabelecimento de novas metodologias para edição do genoma, através das quais é gerada uma quebra da dupla cadeia de DNA (DSB) em locais específicos do genoma, sendo esta posteriormente reparada por mecanismos celulares, que incluem Reparação Direta por Homologia (HDR) ou União das Extremidades Não Homóloga (NHEJ). Para obter esta DSB, foram projetadas nucleases de edição do genoma, que incluem meganucleases, *zinc finger nucleases* (ZFN), *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) e a nuclease Cas9 associada a *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR), pequenas sequências de pares de ácidos nucleicos intercaladas e que se repetem ao longo de certos locais do genoma das células, ou Sistema CRISPR/ Cas9.^{1; 6; 7; 8}

O CRISPR, um sistema imunológico adaptativo guiado por RNA, presente em bactérias e Archae com o propósito de defesa contra organismos invasores, revolucionou a edição genética em diversos organismos, incluindo seres humanos.^{1; 2; 9; 10} Os sistemas CRISPR/Cas, apesar de demonstrarem alguma semelhança na sua estrutura, existem em grande variedade, sendo o tipo II, proveniente da bactéria *Streptococcus pyogenes*, e que se diferencia por utilizar uma única nuclease, a Cas9, o mais utilizado para a edição do genoma.^{9; 11; 12; 13}

O sistema CRISPR/Cas9 é superior em termos de simplicidade, eficiência e flexibilidade quando comparado com as restantes técnicas. Contrariamente às nucleases que reconhecem a sequência alvo através da interação DNA-proteína, o sistema CRISPR/Cas9 reconhece a sequência alvo através de emparelhamento de bases, o que significa que não é

necessário projetar uma proteína que reconheça a sequência de DNA. Assim sendo, é apenas necessário elaborar um RNA guia que direciona a nuclease Cas9 para efetuar a clivagem da sequência, o que leva a que o design e execução deste método seja mais simples e fácil de aplicar.^{8; 11; 14} Além disso, este sistema é eficiente em editar múltiplos genes, é menos citotóxico e apresenta um custo relativamente mais baixo.^{12; 15; 16}

2. CLUSTERED REGULARLY INTERSPACED SHORT PALINDROMIC REPEATS (CRISPR)

2.1. Origem

O CRISPR foi descoberto em 1987 no genoma de *Escherichia coli*, quando cientistas estudavam o gene *iap*, perto do qual encontraram sequências alternadas de repetição e não repetição até então desconhecidas. Posteriormente, descobriu-se que este sistema se encontrava em inúmeras bactérias e em Archaea.^{11; 17; 18; 19} Este conjunto de sequências foi inicialmente denominado de *Short Regularly Spaced Repeats* (SRSR), sendo mais tarde alterado para *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR).^{11; 20} Ao examinar várias matrizes CRISPR em bactérias e Archaea, foi possível detetar na sua proximidade um conjunto de genes que codificavam proteínas possivelmente associadas ao CRISPR, os genes associados ao CRISPR ou genes Cas.^{8; 17; 18; 19}

Um conjunto de pesquisas realizadas mais tarde revelou que o CRISPR seria um sistema de defesa contra infeções por organismos exógenos.^{10; 17} Estudos realizados com a bactéria *Streptococcus thermophilus* revelaram semelhanças entre as sequências não repetidas, denominadas espaçadores, e muitas sequências presentes em organismos exógenos, como plasmídeos e bacteriófagos.^{8; 17} Além disso, ao colocar a mesma bactéria em contacto com bacteriófagos virulentos, verificou-se a incorporação de novos espaçadores na matriz CRISPR, sendo que as sequências desses novos espaçadores eram semelhantes às sequências do genoma dos bacteriófagos responsáveis pela infeção.^{8; 18} Assim, foi possível confirmar que este sistema apresenta a capacidade de integrar elementos genéticos de organismos exógenos, sob a forma de novas sequências espaçadoras, no seu próprio genoma.^{18; 21} É de realçar o papel desempenhado pelos genes Cas, uma vez que estes são responsáveis por incorporar os espaçadores na matriz CRISPR quando ocorre a infeção, e por codificar proteínas essenciais para que ocorra uma resposta imunológica. Ao haver registo genético

de ataques prévios, quando ocorre uma nova infecção por um invasor anterior é desencadeado um mecanismo de defesa adaptativo.^{4; 19}

Os dados adquiridos pela sequenciação do genoma indicam que o sistema CRISPR/Cas pode ser encontrado em 45% das bactérias e 84% das archaea.^{11; 16}

2.2. Estrutura do Locus CRISPR

O locus CRISPR é constituído por sequências de repetição parcialmente palindrómicas, que podem variar de 25 a 35 pares de bases (pb) , e por espaçadores, que surgem aquando da incorporação de fragmentos do material genético de organismos invasores, como fagos e plasmídeos, no genoma hospedeiro, e que são denominados protoespaçadores até ocorrer a inserção.^{11; 16} O número de espaçadores numa matriz CRISPR varia bastante, podendo o espaçador ser descrito como *naive*, caso se trate do primeiro contacto com o organismo responsável pela infecção, ou como *primed*, caso exista uma invasão prévia por parte do organismo patogénico.¹¹ Após uma infecção ocorre uma resposta imunológica, na qual os espaçadores são incorporados na matriz CRISPR, o que fornece um registo genético cronológico de todas as infeções anteriores. Além disso, caso ocorra uma nova infecção por um invasor anterior, é possível desenvolver um mecanismo de defesa.^{22; 23}

A montante da matriz CRISPR localiza-se a sequência líder, rica em timina (T) e adenina (A), que é responsável por promover a transcrição da matriz CRISPR e por direcionar a orientação dos espaçadores recém-adquiridos.^{11; 24; 25}

A atividade do sistema CRISPR requer, também, um conjunto de genes associados ao CRISPR, conhecidos como genes Cas, que precedem a matriz CRISPR e a sequência líder.²⁶ Estes genes codificam as proteínas Cas, que são essenciais para a resposta imunológica, uma vez que elas são associadas ao RNA transcrito a partir dos loci CRISPR, formando complexos capazes de degradar material genético invasor, no caso de este ter sido responsável por uma invasão prévia.²⁴

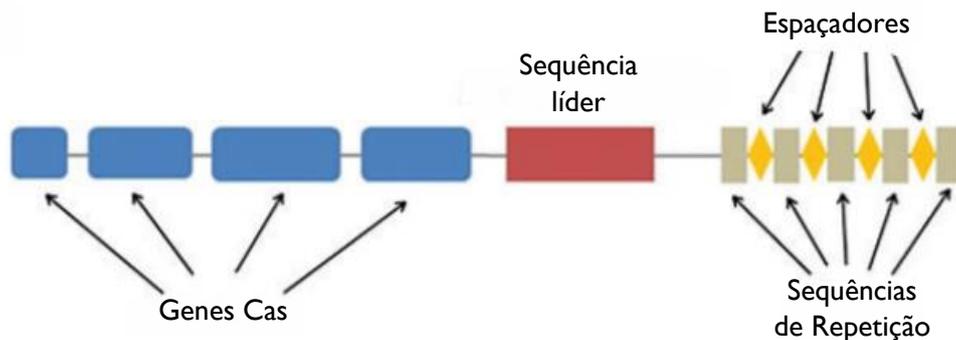


Figura 1. Estrutura típica do locus CRISPR. (Adaptado de Zhang, Wen e Guo, 2014)²⁷

2.3. Tipos de Sistemas CRISPR/Cas

Apesar de apresentarem uma atividade semelhante, os sistemas CRISPR/Cas exibem diversidade estrutural e mecânica, nomeadamente diferentes arranjos dos loci CRISPR e variações nas proteínas Cas. Os sistemas CRISPR/Cas foram inicialmente subdivididos em três tipos principais, I, II e III, cada um deles distinguido pela presença de diferentes proteínas Cas, Cas3, Cas9 e Cas10, respetivamente, sendo que cada tipo abrange vários subgrupos.¹⁸

Há relativamente pouco tempo surgiu uma nova classificação, que compreende duas grandes classes e seis tipos de sistemas CRISPR/Cas. A classe I, que abrange os tipos I, III e IV, caracteriza-se por um complexo efetor, responsável por clivar sequências do DNA alvo, constituído por múltiplas proteínas Cas, enquanto que na classe II, que inclui os tipos II, V e VI, uma única proteína Cas de múltiplos domínios constitui o complexo efetor. Os sistemas CRISPR/Cas da classe I podem ser encontrados em bactérias e archaea, constituindo cerca de 90% de todos os loci CRISPR identificados. Os restantes 10% correspondem à classe II e são encontrados quase exclusivamente em bactérias.^{4; 5; 17} Cada tipo é ainda classificado em vários subtipos, de acordo com variações adicionais na composição e estrutura genética.¹⁷

A distribuição das proteínas Cas varia bastante entre os diferentes tipos, o que significa que uma ou mais proteínas Cas desempenham diferentes funções nos vários sistemas CRISPR/Cas.¹⁶ Algumas proteínas, como a Cas I e Cas2, estão presentes na maioria dos sistemas, enquanto outras são proteínas associadas a determinados tipos de sistema.²⁶

Após o DNA invasor ser clivado em pequenos fragmentos, estes são incorporados no locus CRISPR como espaçadores que são, então, transcritos em RNA CRISPR (crRNA). Tanto na classe I como na classe II o crRNA direciona uma nuclease Cas para clivar a dupla cadeia de DNA alvo.^{10; 27} O Sistema CRISPR/Cas de classe II emprega uma única nuclease, a Cas9, sendo a Cas9 derivada da bactéria *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus pyogenes* Cas9)

(SpCas9) a mais estudada das proteínas Cas9.^{5; 6; 22} Graças à sua simplicidade, o sistema CRISPR/Cas9 é o mais amplamente utilizado para gerar uma quebra na dupla cadeia de DNA alvo que permita editar o genoma.^{4; 11; 28}

3. SISTEMA CRISPR/CAS9

3.1. Mecanismo de Imunidade Adaptativa

O mecanismo de defesa bacteriano mediado pelo sistema CRISPR/Cas inclui 3 etapas: aquisição de protoespaçadores, processamento e interferência. Na fase de aquisição, o material genético do organismo invasor é incorporado como espaçadores na matriz CRISPR, o que permite o reconhecimento e resposta a uma futura invasão pelo mesmo organismo.^{9; 11} Na etapa seguinte ocorre a expressão dos genes Cas e a transcrição do locus CRISPR num precursor de crRNA (pré-crRNA) que, posteriormente, é clivado e processado por proteínas Cas ou ribonucleases celulares, originando unidades menores e maduras de crRNA, que é composto por uma sequência espaçadora entre fragmentos das sequências de repetição. Por fim, durante a etapa de interferência, os ácidos nucleicos invasores, ao serem idênticos aos espaçadores, são reconhecidos e destruídos pelo crRNA e pelas endonucleases Cas, impedindo, assim, a sua integração e replicação no genoma do hospedeiro.^{1; 4; 11}

O sistema CRISPR/Cas9 tem sido largamente explorado, uma vez que emprega uma única nuclease, a Cas9, que se complexa com 2 sequências curtas de RNA, crRNA e tracrRNA, para funcionar como endonuclease específica de local, o que revela um grande potencial para ser utilizado como uma ferramenta simples e eficiente na edição do genoma.^{11;}

^{15; 27}

Assim sendo, no sistema CRISPR/Cas9, durante a fase de aquisição, as proteínas Cas1 e Cas2 são responsáveis pela aquisição do espaçador, quer seja na excisão do protoespaçador do DNA invasor quer seja na sua incorporação na matriz CRISPR, sendo essencial que ambas operem como um complexo, uma vez que individualmente não têm a capacidade de realizar a aquisição com sucesso. Para selecionar os protoespaçadores que irão ser incorporados na matriz existem sequências curtas, de 2 a 5 nucleótidos, localizadas junto ao local alvo e denominadas *Protospacer Adjacent Motives* (PAM), que são específicas para cada subtipo e bactéria CRISPR/Cas. Os PAM determinam o alinhamento do espaçador na matriz e têm um papel crucial na fase de interferência. Além da Cas1 e Cas2, também a Cas4 apresenta atividade neste sistema durante a etapa de aquisição. Da integração de um

protoespaçador resulta, então, uma matriz CRISPR com um novo espaçador entre sequências de repetição que, por ter sido adquirido mais recentemente, é o primeiro na matriz CRISPR, o que revela a organização cronológica dos espaçadores na matriz.^{11; 18; 29; 30}

Na fase de expressão, quando ocorre uma nova infecção por um invasor anterior, é ativada a transcrição do locus CRISPR em RNA, sendo essencial o papel desempenhado pela Ribonuclease III do hospedeiro, ou RNase III, pela proteína Cas9 e pela molécula de RNA CRISPR trans-ativador (tracrRNA) ao longo desta etapa. Após o locus CRISPR ser transcrito em pre-crRNA, o tracrRNA, que consiste num pequeno RNA complementar das sequências de repetição transcritas do pré-crRNA, e que contém 3 estruturas em gancho de cabelo na sua extremidade terminal 3', emparelha com o pré-crRNA. O tracrRNA é essencial para a maturação do pré-crRNA e, além disso, do seu emparelhamento com o pré-crRNA resulta uma cadeia dupla de RNA. Este complexo tracrRNA:pré-crRNA é estabilizado pela proteína Cas9, para que posteriormente ocorra a clivagem do pré-crRNA pela RNase III, o que originará as unidades maduras de crRNA.^{11; 18; 29; 30}

Na etapa de interferência, após a maturação do pré-crRNA, o crRNA permanece complexado com o tracrRNA como uma dupla cadeia de RNA, e este complexo é capaz de alterar a conformação da endonuclease Cas9, levando à sua ativação. Após ativação, a Cas9 é guiada pelo crRNA e tracrRNA até ao DNA alvo para efetuar a sua clivagem, sendo necessário encontrar o PAM para que a clivagem ocorra. O PAM é uma sequência reconhecida na forma de cadeia dupla pela Cas9, sendo uma das mais comuns para a Cas9 a NGG, presente em *Streptococcus pyogenes*, sendo que N pode ser qualquer nucleótido e G é o nucleótido guanina. O PAM é responsável pela distinção entre *self* e *non-self*, de modo a que o sistema atinja apenas o que é reconhecido como invasor (*non-self*) e que evite atingir o próprio organismo (*self*). Depois do PAM ser identificado e localizado, a Cas9 é, então, responsável por quebrar a dupla cadeia de DNA, o que acontece graças à sua estrutura. A Cas9 possui 2 lóbulos com diferentes funções, um de reconhecimento (*Recognition Lobe*) (REC) e um de nuclease (*Nuclease Lobe*) (NUC). O REC é responsável pela interação entre o crRNA e o DNA invasor, sendo que o REC, dependendo da conformação adquirida, interage com o DNA de diferentes formas, o que demonstra que a Cas9 não possui especificidade em relação ao direcionamento, daí a necessidade da presença do complexo crRNA:tracrRNA. Já o NUC, que contém o local de reconhecimento do PAM, é responsável pela clivagem da dupla cadeia de DNA, o que acontece graças aos dois domínios catalíticos que apresenta, HNH e RuvC. O domínio HNH, cuja estrutura é mais simples, cliva a cadeia de DNA complementar ao crRNA, enquanto que o domínio RuvC, estruturalmente mais

complexo, cliva a cadeia não complementar. Assim, ocorre uma rutura da dupla cadeia do DNA alvo, 3 nt a montante do PAM, o que permite conferir imunidade à bactéria hospedeira.^{11; 18; 29; 30}

3.2. Ferramenta de Edição do Genoma

A descoberta do enorme potencial do sistema CRISPR como um mecanismo de defesa adaptativo abriu portas para que os cientistas projetassem este sistema como uma ferramenta para a edição do genoma.^{8; 18; 31}

O Sistema CRISPR/Cas9 é o mais utilizado no laboratório, graças à simplicidade do seu mecanismo, pois depende apenas de uma única endonuclease, a Cas9, para clivar com precisão a cadeia dupla de DNA. Esta ferramenta é utilizada numa grande variedade de tipos de células e alguns organismos multicelulares e, para facilitar todo o processo, os cientistas projetaram um RNA quimérico que resulta da fusão do crRNA e do tracrRNA, o que origina um único RNA guia (*single guide RNA*) (sgRNA), tornando todo o processo mais cómodo. O design deste sgRNA revela ter, então, uma grande importância, no sentido em que torna o processo mais simples, além de ter a função de guiar a nuclease até ao DNA alvo.^{1; 8; 16; 32}

A molécula de sgRNA é constituída por uma sequência guia de aproximadamente 20 nt na posição 5' que se liga à sequência do DNA alvo, direcionando todo o sistema para o local alvo, e por uma sequência complementar em gancho de cabelo que se liga à Cas9. Através do complexo sgRNA:Cas9 é possível, então, direcionar a Cas9 para o local alvo, sendo essencial o reconhecimento da sequência PAM para que haja emparelhamento da sequência de sgRNA com o DNA alvo, na direção 3'-5'. O PAM leva a que a Cas9 sofra uma mudança na sua conformação, que lhe permite não só desenrolar a cadeia de DNA, mas também passar da ligação à clivagem, o que resulta na DSB do DNA invasor (Figura 2). Assim sendo, é possível editar o genoma através de engenharia genética, pois ao alterar a sequência de 20 nt na posição 5' do sgRNA, que se irá ligar por complementaridade ao DNA, é alterado o alvo, o que possibilita que qualquer sequência de DNA seja clivada pela Cas9. É de realçar novamente que, para que esta clivagem ocorra, é necessária a presença da sequência PAM no DNA alvo, uma vez que, na sua ausência, o DNA alvo não é reconhecido pela Cas9, ainda que a sequência de sgRNA seja complementar na sua totalidade com a sequência alvo. Assim, poderá ocorrer uma DSB por ação da Cas9, 3 nt a montante do PAM,

caso o sgRNA se ligue por complementaridade à sequência alvo, onde deverá encontrar-se o PAM.^{29; 30}

Após ser gerada uma DSB no local previamente definido, o processo de edição do genoma passa pela reparação da mesma. A DSB é, então, corrigida por mecanismos de reparação celulares, o que pode ocorrer através da NHEJ ou da HDR (Figura 2).^{8; 18; 30; 32; 33; 34}

O mecanismo de NHEJ consiste na união de fragmentos de DNA ao acaso, que se ligam a ambas as extremidades da DSB no caso de se verificar alguma complementaridade, sendo esta reparação efetuada pela maquinaria celular endógena, não necessitando de nenhuma sequência molde corretiva de DNA. Apesar de este mecanismo ser o que ocorre com maior frequência na correção da DSB executada pela Cas9, é mais propenso a erros, pois induz mutações aleatórias. Estas mutações, que tanto podem ser inserções ou deleções de nucleótidos no local da DSB, podem, por um lado, ser benéficas, coincidindo com o objetivo final da edição genética, mas, por outro lado, podem levar a alterações na função do gene, que se revelam difíceis de prever.^{8; 11; 18; 32; 34} As mutações resultantes deste mecanismo podem originar um codão stop prematuro e/ou um polipeptídeo não funcional, o que leva à interrupção da transcrição e, conseqüentemente, à inativação do gene, o que pode ser útil na clínica, uma vez que a disrupção do gene fornece uma oportunidade terapêutica.³⁴

O mecanismo de HDR ocorre menos frequentemente, mas é o mecanismo preferencial, uma vez que envolve o uso da região homóloga da cadeia de DNA não editada como um modelo para corrigir o DNA danificado, resultando numa reparação sem erros. Através deste mecanismo também pode ser utilizada uma sequência molde exógena corretiva de DNA para proceder à reparação, de modo a facilitar a edição desejada no genoma. A sequência molde de DNA é entregue com o sgRNA e com a Cas9 à célula, e é de seguida integrada no local onde ocorreu o corte, sendo que daí podem resultar modificações mais ou menos eficazes dependendo do tipo de célula, alvo e sequência molde. É importante que na cadeia de DNA não esteja presente o PAM, uma vez que a Cas9 poderia ligar-se e clivar a sequência inserida. Assim, este mecanismo é mais rigoroso e menos propício a erros, causando modificações mais precisas e específicas, sendo, por isso, bastante interessante para fins terapêuticos.^{8; 11; 18; 32; 34}

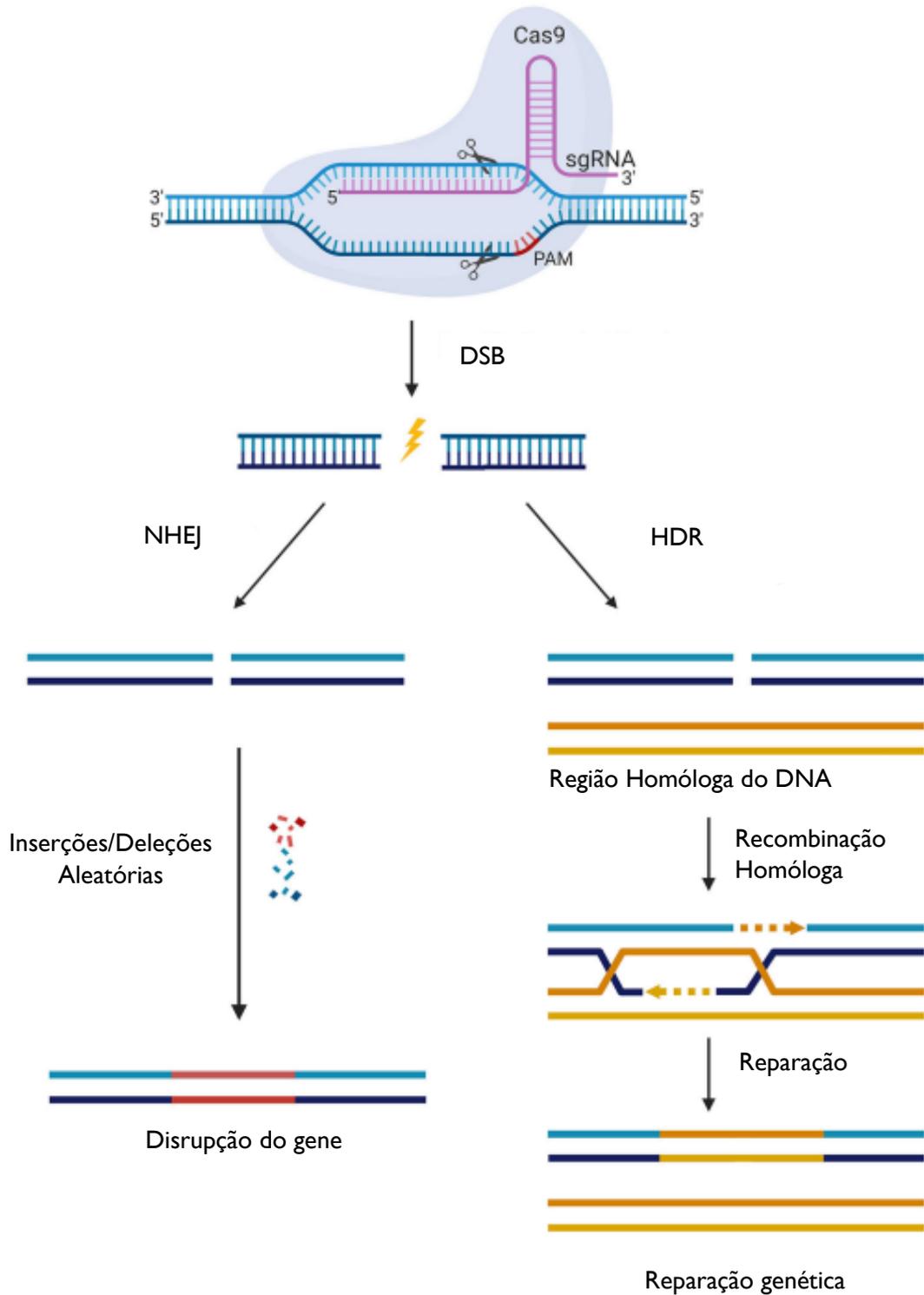


Figura 2. Edição do genoma mediada pelo Sistema CRISPR/Cas9 pelos mecanismos NHEJ e HDR (Adaptado de Uddin, Ruddin e Sen)³⁴

3.3. Formulação – Entrega do Sistema CRISPR/Cas9 às células-alvo

Para que a edição de genes seja eficaz e segura é necessário que a entrega dos componentes da formulação do Sistema CRISPR/Cas9 às células-alvo seja eficiente, de forma a minimizar a ocorrência de efeitos *off target* e garantir que a célula ou tecido alvo foi alcançada pelo sistema.^{34; 35} Desde cedo que várias abordagens, técnicas e métodos para a entrega deste sistema às células-alvo têm sido analisados, constituindo um desafio constante para a engenharia genética.^{11; 35}

Os vetores virais constituem um método bastante utilizado e versátil para efetuar a transferência do Sistema CRISPR/Cas9 para as células, tanto *in vitro* como *in vivo*.³⁵ Ao remover ou modificar a porção do genoma do vírus que lhe confere patogenicidade, nomeadamente a replicação na célula hospedeira, é possível utilizar estes vetores virais para efetuar a entrega dos componentes da formulação nas células alvo. Os vetores virais a que mais se recorre são derivados dos lentivírus (LV), vírus adeno-associados (AAV) e adenovírus (AV). Os LV são capazes de integrar o material genético exógeno na célula alvo, possuindo uma grande capacidade de empacotamento, o que permite a transferência do material de interesse em maior quantidade ou de maior dimensão, e são pouco imunogénicos. No entanto, fazem esta integração de forma aleatória, o que constitui uma desvantagem, no sentido em leva a inserções não desejadas, causando mutações. Os AAVs apresentam imunogenicidade moderada e são capazes de infetar células que se encontrem ou não em divisão, mas a sua capacidade de empacotamento é bastante limitada. A solução passa por utilizar uma Cas9 de tamanho inferior, como a proveniente de *Staphylococcus aureus*, que, apesar de ser mais pequena do que a Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, normalmente mais utilizada, é igualmente eficaz, ou pela utilização de AAVs duplos que entregam separadamente o DNA e o sgRNA, mas a injeção de dois AAVs na célula alvo é um desafio.³⁵ O Sistema CRISPR/Cas9 pode ser empacotado como DNA do plasmídeo que codifica os seus componentes, incluindo a Cas9 e o sgRNA, ou pode ser entregue como mRNA de Cas9 e sgRNA.³⁴ Os AAV permitem transportar o material exógeno até ao local alvo, sendo a integração no genoma do hospedeiro muito rara de ocorrer, graças à sua permanência na forma episomal, o que representa uma vantagem.^{1; 15} Os Adenovírus, tal como os AAV, são também vetores virais que raramente sofrem integração no genoma do hospedeiro. Além disso, estes vetores virais apresentam boa capacidade de empacotamento. No entanto, podem causar a destruição das células, pois induzem um aumento da resposta imunitária da célula hospedeira. Os vetores virais apresentam-se, então, como um método

eficaz na transferência do Sistema CRISPR/Cas9 para as células-alvo, mas têm o potencial de provocar respostas imunológicas e citotóxicas, e também efeitos *off target*.^{11; 34}

A entrega do Sistema CRISPR/Cas9 pode também ser efetuada por métodos físicos, que incluem microinjeção e eletroporação, sendo que tanto um como o outro apresentam uma fraca eficácia de entrega em aplicações *in vivo*.³⁵ A microinjeção é bastante utilizada na projeção e manipulação de zigotos, sendo apenas adequada para entregas *ex vivo*. É uma técnica invasiva, trabalhosa e morosa, o que a torna pouco viável, pois requer que cada célula seja injetada individualmente. Além disso, existe a possibilidade de poderem ocorrer danos na célula durante o processo.³⁴ A eletroporação é bastante utilizada na entrega da tecnologia para aplicações *ex vivo*, mas pode ser também utilizada *in vivo* para certos tecidos-alvo. Apesar de possibilitar a edição simultânea de várias células e de ser menos invasiva, requer um choque de alta voltagem para permeabilizar as células, o que pode ser tóxico e pode levar à permeabilização permanente das células.^{7; 11; 34}

A entrega do Sistema CRISPR/Cas9 recorrendo a plasmídeos consiste num método relativamente simples e de fácil produção *in vitro*, no qual as células são transferidas com o plasmídeo e os componentes do Sistema CRISPR/Cas9 para o local alvo por eletroporação, sendo que esta técnica apenas pode ser administrada *ex vivo* em seres humanos. Esta metodologia apresenta como desvantagens o facto de permitir a inserção aleatória do plasmídeo, em parte ou no seu todo, no genoma da célula alvo, e também a ocorrência de mutações *off-target*, que resultam da persistência do DNA do plasmídeo e dos seus integrante na célula alvo.^{1; 11}

A utilização de Ribonucleoproteínas (RNPs) na transferência do sistema CRISPR/Cas9 para as células-alvo representa uma abordagem alternativa vantajosa, pois reduz o potencial *off target*, enquanto mantém a eficácia da edição do genoma, graças à sua expressão transitória e rápida eliminação na célula.^{1; 11; 34}

Vetores sintéticos não virais têm vindo a ser desenvolvidos, constituindo uma alternativa favorável aos restantes métodos. Comparativamente aos vetores virais, os sintéticos não permitem a integração do material genético exógeno no genoma do hospedeiro, não são imunogénicos, há a possibilidade de ampliar a capacidade de empacotamento caso esta seja insuficiente para incluir todos os constituintes da formulação, e a produção em larga escala é relativamente fácil de executar. Contudo, estes vetores caracterizam-se por uma entrega da formulação menos eficiente do que a apresentada pelos vetores virais, razão pela qual estes continuam a ser os mais utilizados em grande parte dos ensaios clínicos para edição do genoma. Os vetores sintéticos não virais efetuam a entrega

do sistema através de um transportador, que pode ser lipídico, inorgânico ou um polímero.^{5;}

28

Uma vez selecionado o método de entrega da formulação às células alvo, a edição do genoma pelo sistema CRISPR/Cas9 pode ocorrer *ex vivo*, onde as células são geneticamente modificadas fora do paciente, em cultura, sendo posteriormente reintroduzidas no paciente, ou *in vivo*, através da edição das células diretamente no paciente.^{33; 34}

A edição *ex vivo*, comparativamente à edição *in vivo*, é mais viável, precisa e segura, pois o paciente não é diretamente exposto à ferramenta de edição do genoma, e as células modificadas são sujeitas a um controlo mais rigoroso antes de serem transplantadas para o paciente.^{33; 34} Esta metodologia está limitada a *hematopoietic stem and progenitor cells* (HSPCs) e células T, células capazes de sobreviver e de ser expandidas em cultura, pois na edição *ex vivo* é essencial assegurar a sobrevivência e retenção da função *in vivo* das células fora do paciente após a manipulação genética, a cultura extensa *in vitro* e o aumento de células adequado para efetuar a sua reintrodução no paciente.³⁴

A manipulação de células *ex vivo* com o Sistema CRISPR/Cas9 mostrou ter potencial terapêutico para doenças hematológicas, como a anemia das células falciformes (*sickle-cell anemia*) (SCD) e a β -talassémia, e para a imunoterapia do cancro. Porém muitos tecidos não são adequados para este método, o que acaba por limitar a sua utilidade terapêutica para outras doenças genéticas.³⁴

A edição *in vivo* é, portanto, necessária para expandir a utilidade do sistema CRISPR/Cas9 para tratar uma ampla gama de doenças genéticas, como a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) e a Tirosinémia Hereditária. O sistema CRISPR/Cas9 pode ser administrado *in vivo* sistemicamente através de injeções intravenosas, sendo introduzido na corrente sanguínea através das artérias que levam ao tecido alvo, ou pode ser injetado diretamente no tecido alvo.³⁴

Porém, da entrega do sistema CRISPR/Cas9 *in vivo* pode resultar degradação por proteases circulantes ou nucleases, e eliminação pelo sistema de fagócitos mononucleares (MPS). Além disso, o sistema CRISPR/Cas9 deve atingir o tecido alvo e contornar o endotélio vascular para chegar às células-alvo, mas muitas vezes os tecidos estão fortemente conectados ao endotélio por junções célula-célula, o que impede o acesso a veículos de entrega maiores. Quando o sistema CRISPR/Cas9 alcança as células-alvo, ele é internalizado, o que geralmente é facilitado pela endocitose.³⁴

4. APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

O Sistema CRISPR/Cas9 é programável, o que significa que pode ser programado para reconhecer e encontrar sequências de DNA alvo específicas, e efetuar uma quebra nessas mesmas sequências. Assim, a tecnologia CRISPR pode ser programada para efetuar a clivagem do DNA próximo ou no local correspondente a uma mutação, permitindo a edição desse genoma.³⁵

Uma vez que através desta tecnologia é possível editar qualquer tipo de célula, ficou claro que o Sistema CRISPR/Cas9 é capaz de editar o genoma humano, destacando-se o seu potencial para fins terapêuticos.^{36; 37} Ao longo dos últimos anos, o Sistema CRISPR/Cas9 tem mostrado o seu enorme potencial na terapia génica, isto é, na introdução de genes funcionais nas células alvo com a finalidade de tratar patologias causadas por mutações genéticas, sendo possível aplicar esta tecnologia em células somáticas, células de órgãos e tecidos, e em células da linha germinativa, as células que originam os óvulos e espermatozóides ou as células de um embrião inicial. Assim, a terapia génica é atualmente permitida para as células somáticas, enquanto que para as células da linha germinativa é altamente controversa, uma vez que levanta muitas questões relativas à ética e à segurança.³⁴ O Sistema CRISPR/Cas9 pode, portanto, ser utilizado como uma tecnologia terapêutica no tratamento de várias patologias, incluindo doenças genéticas, infeções virais e cancro, sendo de salientar que algumas destas terapias já alcançaram a fase de ensaios clínicos.^{30; 38; 39; 40}

Doenças genéticas

O sistema CRISPR / Cas9 pode ser aplicado no tratamento de doenças genéticas, pois é capaz de produzir alterações específicas no genoma, que permitem a correção das mutações responsáveis pela doença, havendo vários ensaios clínicos a decorrer para algumas destas patologias.

Uma dessas doenças é a Fibrose Cística, causada por uma mutação no gene CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Receptor*), que é responsável por regular o transporte epitelial de fluidos. Ao haver perda desta função, há acumulação de muco nos tratos pulmonar e gastrointestinal, que causa dificuldade respiratória e várias infeções. Graças ao Sistema CRISPR/Cas9, foi possível corrigir as mutações presentes em células estaminais intestinais mutantes de pacientes com fibrose cística e restaurar a sua função *in vitro*.^{28; 33} Já a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) caracteriza-se por uma mutação no gene da distrofina. A distrofina codifica uma proteína que assegura a integridade das fibras

musculares, logo esta patologia manifesta-se por um enfraquecimento geral dos músculos cardíaco, respiratório e esquelético, levando a uma morte prematura. As estratégias usadas por parte do Sistema CRISPR/Cas9 para corrigir a mutação passam pela correção de mutações pontuais, correção dos genes com o exão em falta, e restauração da estrutura de leitura da DMD por exclusão dos exões mutados. A correção dos genes que apresentam o exão 44 em falta foi feita por “*exon knock-in*”, tendo sido adicionado o exão 44 ausente. Para recuperar a estrutura de leitura do gene da distrofina foram efetuadas deleções únicas e múltiplas de exões, sendo que as deleções múltiplas permitiram excluir um conjunto de exões responsáveis por uma grande parte das mutações que causam a doença.^{12; 13; 15; 28; 30; 33} É ainda de referir a doença das células falciformes (*Sickle Cell Disease*) (SCD), ou anemia falciforme, causada por uma mutação no gene da β -globina, que leva à expressão do gene mutado da hemoglobina falciforme (HbS). O Sistema CRISPR/Cas9 é utilizado para reparar as mutações no gene da β -globina em células estaminais hematopoiéticas do paciente *in vitro*, que são depois novamente transplantadas para o paciente.^{8; 28}

Infeções Virais

Por se tratar de um sistema de defesa imune adaptativo, o Sistema CRISPR/Cas9 demonstrou potencial no combate de infeções virais, através da interrupção dos mecanismos de replicação viral, o que permite impedir a infeção pelo vírus e reparar a célula infetada.¹²

Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

O HIV é um vírus que ataca principalmente o sistema imunológico humano, especialmente as células TCD4+, sendo que as infeções provocadas pelo HIV ao longo do tempo levam ao Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA).^{23; 38; 39} O HIV-1 é o tipo mais comum deste vírus, tendo maior capacidade de transmissão quando comparado com o HIV-2.²³ Quando ocorre a infeção, o vírus integra-se no genoma das células TCD4+ e, ao ser transcrito, leva à expressão viral e propagação do vírus no organismo, bloqueando a imunidade celular e humoral.^{23; 38}

A infeção por HIV compreende uma fase de infeção ativa e uma fase de infeção latente, sendo que, no hospedeiro infetado, há células com infeção ativa e células com infeção latente ao mesmo tempo. Na fase ativa ocorre replicação ativa do vírus e infeção das células, levando ao aparecimento de sintomas. Já na fase de latência não ocorre replicação ativa do vírus, mas o genoma viral que se encontra integrado nas células hospedeiras não é

eliminado, o que significa que essas células, conhecidas como reservatório latente, podem sofrer reativação, produzindo novas partículas virais.²³ Esta fase de latência é a razão da ineficácia do tratamento da infecção com anti-retrovirais, pois ainda que esta terapia iniba a replicação do HIV-1, não tem nenhum efeito na infecção latente, logo o genoma viral existente nas células hospedeiras pode ser reativado. Assim, a terapia com anti-retrovirais contribui apenas para aumentar a expectativa de vida dos pacientes infetados com HIV, daí o interesse de explorar novas abordagens mais eficazes para tratar o HIV.^{23; 38; 39}

Para combater a infecção latente existem duas estratégias que utilizam a tecnologia CRISPR/Cas9, constituindo uma nova abordagem terapêutica para o tratamento da infecção por HIV.^{12; 23} Uma das formas de combater a infecção é através da projeção de um sistema CRISPR/Cas9 capaz de atingir as *Long Terminal Repeats* (LTRs), responsáveis por regular o gene do HIV, e localizadas no genoma do HIV, que é integrado nas células T CD4+.²³ O sistema CRISPR/Cas9 é capaz de remover partes do genoma do HIV integrado nas células hospedeiras, o que permite reduzir a produção do vírus e eliminar o que se encontrava em fase de latência, sendo possível, desta forma, eliminar completamente o HIV-1 do genoma das células infetadas do hospedeiro.^{38; 39} Além disso, alguns estudos efetuados demonstraram que o sistema CRISPR/Cas9 também poderia ser útil na imunização contra a infecção por HIV. De facto, ao integrar este sistema no genoma de células T, e após estas serem infetadas pelo HIV, verificou-se que a expressão viral nestas células era inferior relativamente a células não manipuladas. Além disso, este sistema foi também integrado em *human pluripotent stem cells* (hPSC) que foram diferenciadas em macrófagos, sendo que, após serem infetadas pelo HIV, essas células mostraram-se significativamente resistentes ao vírus e a futuras infecções pelo mesmo.²³

Uma outra abordagem consiste em direcionar o Sistema CRISPR/Cas9 para os co-receptores, que são essenciais para a entrada do HIV nas células. O *C-C chemokine receptor type-5* (CCR5) é o co-receptor mais importante e, ao atingi-lo com o sistema CRISPR/Cas9, verifica-se resistência das células T CD4+ ao vírus. Vários estudos realizados demonstraram que podem ser geradas células resistentes ao HIV através da ablação do gene CCR5 *ex vivo* de células T e CD34+ *hematopoietic stem and progenitor cells* (HSPCs).^{12; 38}

Vírus da Hepatite B (HBV)

O HBV é o agente patogénico mais importante da doença hepática, possuindo um *Covalently Closed Circular DNA* (cccDNA) muito estável, que é responsável pela replicação do

vírus. Ao direcionar o Sistema CRISPR/Cas9 para o *locus* do genoma do HBV, verifica-se uma diminuição significativa do nível de cccDNA, sendo possível inibir a infecção crônica pelo HBV.^{11; 28}

Papilomavírus Humano (HPV)

O HPV é um vírus de DNA cíclico de fita dupla, cujos genes E6 e E7, localizados nas regiões iniciais do HPV16, são carcinogênicos. Foi descoberto que a ocorrência de cancro do colo do útero, o segundo tumor maligno ginecológico mais comum, está relacionada com a infecção por HPV. O sistema CRISPR/Cas9 pode ser direcionado para os genes E6 e E7 de forma a bloquear a expressão das proteínas E6 e E7, o que permite aumentar a apoptose de células tumorais e suprimir o crescimento do tumor subcutâneo em estudos *in vivo*. Esta edição com o sistema CRISPR/Cas9 permitiu ainda bloquear a proliferação do HPV e a eliminação do vírus.^{11; 38}

Cancro

O cancro é uma doença complexa, heterogênea e dinâmica, sendo atualmente a segunda maior causa de morte no mundo.^{11; 38} No genoma do cancro são acumuladas mutações genéticas que podem ativar proto-oncogenes, inativar supressores de tumor e produzir resistência a fármacos.³⁸

O sistema CRISPR/Cas9 tem sido aplicado na manipulação do genoma e epigenoma do cancro de forma a corrigir as mutações oncogênicas, na imunoterapia do cancro, e na eliminação ou inativação de infecções virais carcinogênicas.^{12; 38} A correção das mutações oncogênicas do genoma e epigenoma permite inibir o crescimento das células tumorais e promover a apoptose celular, inibindo assim o crescimento tumoral. A aplicação da tecnologia CRISPR/Cas9 na imunoterapia do cancro passa pela engenharia de células CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor-T*). As células CAR-T são células T geneticamente modificadas para expressar recetores de antígenos quiméricos (CARs) capazes de identificar antígenos específicos das células cancerígenas.¹¹ Na terapia com células CAR-T, as células T extraídas do paciente são geneticamente modificadas para expressar os recetores que visam antígenos especialmente expressos em células cancerígenas, sendo depois transferidas de volta para o paciente. No entanto, a terapia com células CAR-T é complexa, demorada e cara, daí a utilização do sistema CRISPR/Cas9 para melhorar a função das células CAR-T, através da interrupção dos genes que codificam os recetores inibidores das células T e da introdução da sequência CAR.^{12; 38}

5. ÉTICA

O Sistema CRISPR/Cas9 é uma tecnologia revolucionária de edição de genes que tem vindo a ser muito utilizada em diversas pesquisas nos últimos anos. Através da inserção, exclusão ou silenciamento de determinados genes, esta tecnologia permite a correção permanente de mutações genéticas de forma simples e precisa, tendo, por isso, um enorme potencial no desenvolvimento terapêutico.⁴¹

A edição do genoma é permitida no caso das células somáticas, isto é, células em que não ocorre transmissão hereditária, pois as alterações efetuadas afetam apenas o indivíduo que participou na terapia, portanto qualquer potencial risco que daí possa advir é contido dentro desse indivíduo. Já a edição do genoma das células da linha germinativa é bastante controversa, uma vez que remove a autonomia no processo de tomada de decisão dos indivíduos nascidos posteriormente, além de permitir que efeitos colaterais imprevisíveis e permanentes sejam transmitidos às gerações futuras.³⁴ Este tema tem vindo a gerar controvérsia e a ser alvo de grande preocupação e, globalmente, vários cientistas discutiram questões éticas e regulatórias, acabando por concordar que os ensaios que envolvem a edição de genes podem prosseguir desde que desses ensaios não resulte nenhum bebé.⁴²

No entanto, recentemente, em novembro de 2018, o cientista chinês, Dr. He Jiankui anunciou o nascimento das gémeas Lulu e Nana, os primeiros bebés produzidos através da edição genética da linha germinativa.^{43; 44} Através de um ensaio realizado em embriões humanos, o sistema CRISPR/Cas9 modificou o seu genoma antes da sua transferência para o útero, com o objetivo de prevenir a transmissão de uma infeção por HIV do lado paterno.^{44;} ⁴⁵ Neste estudo, o gene do co-recetor CCR5 de embriões humanos foi geneticamente modificado de forma a impedir que o HIV entre nas células, através da mutação CCR5Δ32 que bloqueia essa entrada, conferindo resistência ao vírus.^{34; 43} Contudo, alguns estudos mostraram que o mecanismo de infeção do HIV, que é altamente mutável, pode depender do co-recetor CXCR4, o que sugere que a edição do gene CCR5 não impede a infeção.^{34; 43} Além disso, não se sabe se a modificação no gene CCR5 será benéfica para os bebés, nem os riscos que esta alteração no genoma poderá trazer futuramente para a sua saúde, sendo que o surgimento de possíveis efeitos *off target* ao longo da sua vida constitui uma grande preocupação.^{34; 43} Verificou-se que apenas um dos embriões, Nana, teve edições bem-sucedidas em ambas as cópias do gene, enquanto Lulu teve a edição bem-sucedida em apenas uma das cópias, o que se traduz numa resistência ao HIV questionável em Nana, e inexistente em Lulu.³⁴ Outra das questões que se coloca é a escolha de recorrer pela

primeira vez à utilização desta tecnologia em embriões humanos na prevenção da infecção por HIV, tendo em conta que os pacientes portadores do vírus podem viver, sob regime medicamentoso, de forma saudável, portanto teria sido mais conveniente aplicar o Sistema CRISPR/Cas9 em doenças mais graves.³⁴

Atualmente ainda não somos capazes de compreender os efeitos a longo prazo que poderão advir das alterações efetuadas no genoma, assim como também ainda não sabemos como lidar com os impactos adversos que poderão ser gerados por essas modificações genéticas.³⁵ Assim, a edição de genes da linha germinativa é atualmente muito controversa, pois as alterações efetuadas no genoma destas células são imprevisíveis e os benefícios que poderão advir destas modificações são difíceis de prever, além de sujeitarem as suas gerações futuras a riscos desconhecidos e incontroláveis.⁴³

6. CONCLUSÃO

O Sistema CRISPR/Cas9, um sistema de imunidade adaptativo que surgiu com o estudo de como uma bactéria combate uma infecção viral, rapidamente se tornou numa tecnologia de edição do genoma que tem vindo continuamente a revolucionar investigações nas mais diversas áreas, ao tornar possível a alteração de sequências de DNA de forma precisa em qualquer célula e organismo, destacando-se a sua aplicação no tratamento de diversas patologias. De facto, as várias investigações que têm sido levadas a cabo ao longo dos últimos anos comprovam a utilidade e potencial desta tecnologia na área da saúde, embora ainda existam muitos desafios pela frente que têm de ser superados para que esta metodologia seja considerada eficaz e segura quando aplicada na terapia genética.

A entrega do sistema CRISPR/Cas9 às células continua a ser um desafio, sendo necessário desenvolver formas mais eficazes e seguras de o fazer, uma vez que o sucesso da entrega desta tecnologia às células irá permitir que a edição do genoma seja realizada de forma mais eficiente, precisa e segura para um maior leque de patologias. Também o surgimento de mutações *off target* é uma questão essencial a resolver, uma vez que assegurar a eficácia e a segurança é fundamental para aprimorar e fazer progredir esta tecnologia de forma a ser aplicada em maior escala.

Desde sempre que a engenharia genética foi acompanhada por alguma controvérsia, uma vez que permite manipular o genoma, sendo muitas das vezes desconhecidas as consequências dessa manipulação. O sistema CRISPR/Cas 9 não é exceção, sendo a edição

do genoma humano com esta tecnologia atualmente muito debatida. As questões éticas são uma das principais preocupações da comunidade científica, já que, além das células somáticas, também as células da linha germinativa podem ser editadas com esta ferramenta, o que significa que podem ser introduzidas alterações genéticas irreversíveis e impossíveis de prever a longo prazo, e que irão ser transmitidas às gerações futuras. Assim, é essencial seguir um caminho prudente na forma como o Sistema CRISPR/Cas9 é aplicado, para que este, que tem vindo a mostrar o seu enorme potencial no tratamento de muitas doenças, possa vir a ser aplicado futuramente em larga escala.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WANG, Haifeng; RUSSA, Marie LA; QI, Lei S. - CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. **Annual Review of Biochemistry**. ISSN 0066-4154. 85:1 (2016) 227–264. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014607.
2. HIRAKAWA, Matthew P. *et al.* - Gene editing and CRISPR in the clinic: Current and future perspectives. **Bioscience Reports**. ISSN 15734935. 40:4 (2020). doi: 10.1042/BSR20200127.
3. XIAO-JIE, Lu *et al.* - CRISPR-Cas9: A new and promising player in gene therapy. **Journal of Medical Genetics**. ISSN 14686244. 52:5 (2015) 289–296. doi: 10.1136/jmedgenet-2014-102968.
4. PAUL, Bijoya; MONTOYA, Guillermo - CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications. **Biomedical Journal**. ISSN 23194170. 43:1 (2020) 8–17. doi: 10.1016/j.bj.2019.10.005.
5. HAN, Hua Alexander; PANG, Jeremy Kah Sheng; SOH, Boon Seng - Mitigating off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated in vivo gene editing. **Journal of Molecular Medicine**. ISSN 14321440. 98:5 (2020) 615–632. doi: 10.1007/s00109-020-01893-z.
6. ZHANG, Hong Xia; ZHANG, Ying; YIN, Hao - Genome Editing with mRNA Encoding ZFN, TALEN, and Cas9. **Molecular Therapy**. ISSN 15250024. 27:4 (2019) 735–746. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.01.014.
7. MA, Yuanwu; ZHANG, Lianfeng; HUANG, Xingxu - Genome modification by CRISPR/Cas9. **FEBS Journal**. ISSN 17424658. 281:23 (2014) 5186–5193. doi: 10.1111/febs.13110.
8. RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, Diana Raquel *et al.* - Genome editing: A perspective on the application of CRISPR/Cas9 to study human diseases (Review). **International Journal of Molecular Medicine**. ISSN 1791244X. 43:4 (2019) 1559–1574. doi: 10.3892/ijmm.2019.4112.
9. SINGH, Vijai; BRADDICK, Darren; DHAR, Pawan Kumar - Exploring the potential of genome editing CRISPR-Cas9 technology. **Gene**. ISSN 18790038. 599:2017) 1–18. doi: 10.1016/j.gene.2016.11.008.
10. LEONOVA, Elena I.; GAINETDINOV, Raul R. - CRISPR/Cas9 Technology in Translational Biomedicine. **Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**.

ISSN 14219778. 54:3 (2020) 354–370. doi: 10.33594/000000224.

11. ARALDI, Rodrigo Pinheiro *et al.* - Medical applications of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR/Cas) tool: A comprehensive overview. **Gene**. ISSN 18790038. 745:March (2020) 144636. doi: 10.1016/j.gene.2020.144636.
12. MOLLANOORI, Hasan; TEIMOURIAN, Shahram - Therapeutic applications of CRISPR/Cas9 system in gene therapy. **Biotechnology Letters**. ISSN 15736776. 40:6 (2018) 907–914. doi: 10.1007/s10529-018-2555-y.
13. WU, Shao Shuai *et al.* - Advances in CRISPR/Cas-based Gene Therapy in Human Genetic Diseases. **Theranostics**. ISSN 18387640. 10:10 (2020) 4374–4382. doi: 10.7150/thno.43360.
14. LIU, Bin; SABER, Ali; HAISMA, Hidde J. - CRISPR/Cas9: a powerful tool for identification of new targets for cancer treatment. **Drug Discovery Today**. ISSN 18785832. 24:4 (2019) 955–970. doi: 10.1016/j.drudis.2019.02.011.
15. 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.
16. BANNIKOV, A. V.; LAVROV, A. V. - CRISPR/CAS9, the king of genome editing tools. **Molecular Biology**. ISSN 16083245. 51:4 (2017) 514–525. doi: 10.1134/S0026893317040033.
17. ISHINO, Yoshizumi; KRUPOVIC, Mart; FORTERRE, Patrick - History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious. **Journal of Bacteriology**. 200:7 (2018) e00580-17.
18. RATNER, Hannah K.; SAMPSON, Timothy R.; WEISS, David S. - Overview of CRISPR-Cas9 biology. **Cold Spring Harbor Protocols**. ISSN 15596095. 2016:12 (2016) 1023–1038. doi: 10.1101/pdb.top088849.
19. TANG, Hao; ZHAO, Xiaohui; JIANG, Xingyu - Synthetic multi-layer nanoparticles for CRISPR-Cas9 genome editing. **Advanced Drug Delivery Reviews**. ISSN 18728294. 2020). doi: 10.1016/j.addr.2020.03.001.
20. MOJICA, Francisco J. M.; MONTOLIU, Lluís - On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. **Trends in Microbiology**. ISSN 0966-842X. 24:10 (2016) 811–820. doi: 10.1016/j.tim.2016.06.005.
21. KHADEMPAR, Saedeh *et al.* - CRISPR–Cas9 in genome editing: Its function and medical applications. **Journal of Cellular Physiology**. ISSN 10974652. 234:5 (2019) 5751–5761.

doi: 10.1002/jcp.27476.

22. JIANG, Fuguo; DOUDNA, Jennifer A. - CRISPR – Cas9 Structures and Mechanisms. 2017) 505–531.
23. MOHAMMADZADEH, Iraj *et al.* - CRISPR/Cas9 gene editing: A new therapeutic approach in the treatment of infection and autoimmunity. **IUBMB Life**. ISSN 15216551. April (2020) 1–19. doi: 10.1002/iub.2296.
24. YOSEF, Ido *et al.* - Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. 40:12 (2012) 2–5. doi: 10.1093/nar/gks216.
25. HILLE, Frank *et al.* - The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. **Cell**. ISSN 10974172. 172:6 (2018) 1239–1259. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.032.
26. RATH, Devashish *et al.* - The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. **Biochimie**. ISSN 61831638. 117:2015) 119–128. doi: 10.1016/j.biochi.2015.03.025.
27. ZHANG, Feng; WEN, Yan; GUO, Xiong - CRISPR/Cas9 for genome editing: Progress, implications and challenges. **Human Molecular Genetics**. ISSN 14602083. 23:R1 (2014) 40–46. doi: 10.1093/hmg/ddu125.
28. LI, Hongyi *et al.* - Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. **Signal Transduction and Targeted Therapy**. ISSN 20593635. 5:1 (2020). doi: 10.1038/s41392-019-0089-y.
29. KICK, Leonhard; KIRCHNER, Marion; SCHNEIDER, Sabine - CRISPR-Cas9: From a bacterial immune system to genome-edited human cells in clinical trials. 5979:2017). doi: 10.1080/21655979.2017.1299834.
30. HRYHOROWICZ, Magdalena *et al.* - CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**. ISSN 16614917. 65:3 (2017) 233–240. doi: 10.1007/s00005-016-0427-5.
31. JAVED, Muhammad R. *et al.* - CRISPR-Cas System: History and Prospects as a Genome Editing Tool in Microorganisms. **Current Microbiology**. ISSN 1432-0991. 75:12 (2018) 1675–1683. doi: 10.1007/s00284-018-1547-4.
32. SATO, Masahiro *et al.* - Recent Advances and Future Perspectives of In Vivo Targeted Delivery of Genome-Editing Reagents to Germ cells, Embryos, and Fetuses in Mice. **Cells**. ISSN 2073-4409. 9:4 (2020) 799. doi: 10.3390/cells9040799.

33. SAVIĆ, Nataša; SCHWANK, Gerald - Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. **Translational Research**. ISSN 18781810. 168:2016) 15–21. doi: 10.1016/j.trsl.2015.09.008.
34. UDDIN, Fathema; RUDIN, Charles M.; SEN, Triparna - CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future. **Frontiers in Oncology**. ISSN 2234943X. 10:August (2020). doi: 10.3389/fonc.2020.01387.
35. KOTAGAMA, Odatha W.; JAYASINGHE, Chanika D.; ABEYSINGHE, Thelma - Era of Genomic Medicine: A Narrative Review on CRISPR Technology as a Potential Therapeutic Tool for Human Diseases. **BioMed Research International**. ISSN 23146141. 2019:2019). doi: 10.1155/2019/1369682.
36. NIEMIEC, Emilia; HOWARD, Heidi Carmen - Ethical issues related to research on genome editing in human embryos. **Computational and Structural Biotechnology Journal**. ISSN 20010370. 18:2020) 887–896. doi: 10.1016/j.csbj.2020.03.014.
37. ARTICLE, Review - Bioethical issues in genome editing by CRISPR-Cas9 technology. 2020) 110–120. doi: 10.3906/biy-1912-52.
38. XU, Yuanyuan; LI, Zhanjun - CRISPR-Cas systems: Overview , innovations and applications in human disease research and gene therapy. **Computational and Structural Biotechnology Journal**. ISSN 2001-0370. 18:2020) 2401–2415. doi: 10.1016/j.csbj.2020.08.031.
39. ZHANG, Baohong - CRISPR/Cas gene therapy. **Journal of Cellular Physiology**. ISSN 10974652. July (2020). doi: 10.1002/jcp.30064.
40. ERNST, Martijn P. T. *et al.* - Ready for Repair? Gene Editing Enters the Clinic for the Treatment of Human Disease. **Molecular Therapy - Methods and Clinical Development**. ISSN 23290501. 18:September (2020) 532–557. doi: 10.1016/j.omtm.2020.06.022.
41. TIAN, Xueli *et al.* - CRISPR/Cas9 – An evolving biological tool kit for cancer biology and oncology. **npj Precision Oncology**. ISSN 2397-768X. 3:1 (2019). doi: 10.1038/s41698-019-0080-7.
42. TYAGI, Swati *et al.* - CRISPR-Cas9 system: A genome-editing tool with endless possibilities. **Journal of Biotechnology**. ISSN 18734863. 319:May (2020) 36–53. doi: 10.1016/j.jbiotec.2020.05.008.
43. LI, Jing Ru *et al.* - Experiments that led to the first gene-edited babies: the ethical

failings and the urgent need for better governance. **Journal of Zhejiang University: Science B**. ISSN 18621783. 20:1 (2019) 32–38. doi: 10.1631/jzus.B1800624.

44. HIRSCH, Francois; IPHOFEN, Ron; KOPORC, Zvonimir - Ethics assessment in research proposals adopting CRISPR technology. **Biochemia Medica**. ISSN 13300962. 29:2 (2019) 206–213. doi: 10.11613/BM.2019.020202.

45. BAIG, Abdul Mannan - Human Genome-Edited Babies: First Responder with Concerns Regarding Possible Neurological Deficits! **ACS Chemical Neuroscience**. ISSN 19487193. 10:1 (2019) 39–41. doi: 10.1021/acchemneuro.8b00668.