



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Hugo Lopes Cardoso

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “CRISPR/Cas9 e Nanopartículas Lipídicas: Uma Parceria Para O Futuro” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Cátia Augusto, da Dra. Alexandra Albuquerque e do Professor Doutor João Nuno Sereno de Almeida Moreira, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2022



FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA

Hugo Lopes Cardoso

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “CRISPR/Cas9 e Nanopartículas Lipídicas: Uma Parceria Para O Futuro” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Cátia Augusto, da Dra. Alexandra Albuquerque e do Professor Doutor João Nuno Sereno de Almeida Moreira, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2022

Eu, Hugo Lopes Cardoso, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2017249312, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “CRISPR/Cas9 e Nanopartículas Lipídicas: Uma Parceria Para O Futuro” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 8 de setembro de 2022,



---

(Hugo Lopes Cardoso)

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, por permitirem que estes cinco anos fossem possíveis.

À minha restante família, por estarem sempre lá para mim.

Aos meus amigos, por todos os momentos incríveis.

À equipa do Departamento de Investigação e Desenvolvimento dos Laboratórios Basi, pela experiência proporcionada e pelos conhecimentos transmitidos.

À equipa da Farmácia S. Miguel, pelo acolhimento, pela amizade, pela aprendizagem proporcionada e por toda a ajuda que me deram.

Ao Professor Doutor João Nuno Moreira, pela disponibilidade e pela orientação.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e seus docentes, pela excelente formação concedida.

A Coimbra, pelas tradições e pelos melhores anos da minha vida.

A todos, o meu sincero OBRIGADO!

## Índice

### Capítulo I - Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Lista de Abreviaturas.....	8
1. Introdução.....	9
2. Laboratórios Basi.....	9
3. Análise SWOT.....	10
3.1. Pontos Fortes.....	10
3.1.1. Integração na empresa e ações formativas.....	10
3.1.2. Tarefas propostas e autonomia na execução das mesmas.....	11
3.2. Pontos Fracos.....	12
3.2.1. Tempo de estágio.....	12
3.2.2. Planificação do estágio.....	12
3.2.3. Comunicação com a equipa.....	13
3.3. Oportunidades.....	13
3.3.1. Posicionamento do Farmacêutico ao nível da Indústria.....	13
3.3.2. Um estágio diferenciador.....	13
3.3.2.1. Pesquisa de Mercado ( <i>Market Access</i> ).....	13
3.3.2.2. Relatório Abreviado de Desenvolvimento (RAD).....	14
3.3.2.3. Módulo 3.2.P.2 (CTD) do dossier de AIM.....	14
3.3.2.4. Laboratório I&D.....	15
3.3.2.5. Pedidos de elementos.....	15
3.4. Ameaças.....	15
3.4.1. Número de Farmacêuticos na Indústria.....	15
3.4.2. Estágio de carácter opcional.....	16
4. Considerações Finais.....	16
Referências Bibliográficas.....	17

### Capítulo II - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas.....	19
1. Introdução.....	20
2. Análise SWOT.....	20
2.1. Pontos Fortes.....	20
2.1.1. Equipa técnica.....	20
2.1.2. Aquisição e consolidação de conhecimentos.....	21
2.2. Pontos Fracos.....	21
2.2.1. Preparação potencialmente insuficiente em determinadas áreas do saber.....	21
2.3. Oportunidades.....	22
2.3.1. Requisição de um medicamento sujeito a receita médica (MSRM).....	22
2.3.2. Interação com utentes de perfis farmacoterapêuticos variados.....	22
2.4. Ameaças.....	22
2.4.1. MNSRM, produtos de saúde e bem-estar.....	22
3. Casos Práticos.....	23
3.1. Caso Prático 1: Infecção Urinária.....	23
3.2. Caso Prático 2: Tosse Seca.....	24
3.3. Caso Prático 3: Aftas.....	25

3.4. Caso Prático 4: Doença Hemorroidária .....	25
3.5. Caso Prático 5: Cólicas abdominais .....	26
4. Considerações Finais.....	27
Referências Bibliográficas .....	28

### Capítulo III - Monografia “CRISPR/Cas9 e Nanopartículas Lipídicas: Uma Parceria Para O Futuro”

Lista de Abreviaturas.....	31
Resumo.....	34
Abstract.....	34
1. Introdução ao sistema CRISPR/Cas9.....	35
1.1. Componentes e Mecanismo de corte do DNA.....	35
1.2. Mecanismos de reparação do DNA.....	37
2. Vantagens da CRISPR/Cas9.....	37
3. Limitações à aplicação da CRISPR/Cas9 .....	38
3.1. Especificidade/Efeitos <i>off-target</i> .....	38
3.2. Desfecho da edição .....	39
3.3. Eficiência de edição.....	40
3.4. Imunogenicidade dos componentes do sistema.....	40
3.5. Constrangimento colocado pelo PAM.....	40
3.6. Eficiência da entrega .....	40
4. Aplicações da CRISPR/Cas9.....	41
5. Entrega do sistema CRISPR/Cas9 .....	43
5.1. Formatos para a entrega dos componentes .....	43
5.2. Vetores virais ou não-virais.....	44
6. Obstáculos à entrega do sistema em vetores não-virais.....	45
6.1. Eficiência de encapsulação .....	45
6.2. Estabilidade no meio fisiológico .....	45
6.3. Camuflar dos componentes .....	46
6.4. Especificidade celular.....	46
6.5. Libertação a partir do endossoma .....	46
7. Inovações moleculares e estratégias racionais .....	47
7.1. dCas9, CRISPRi, CRISPRa .....	47
7.2. dCas9-FokI.....	47
7.3. Nickases.....	48
7.4. Paired nickases .....	48
7.5. Base editors.....	49
7.5.1. Cytosine base editor (CBE) .....	49
7.5.2. Adenine base editor (ABE) .....	50
7.5.3. Limitações dos base editors .....	51
7.6. Prime editing .....	52
7.7. Circuitos genéticos.....	54
7.8. High-fidelity variants .....	54
7.9. Variantes SpCas9 com PAMs alternativos .....	55
7.10. Eliminação de determinantes antigénicos.....	56
7.11. Desenho e modificação do sgRNA .....	56
7.11.1. sgRNAs truncados (tru-sgRNAs).....	57

7.11.2. sgRNAs quimicamente modificados .....	57
7.11.3. Inserção de estruturas secundárias .....	59
7.12. <i>Homology-independent targeted insertion (HITI)</i> .....	60
8. Nanopartículas Lipídicas (LNPs) .....	61
8.1. Componentes das LNPs.....	62
8.2. Acumulação a nível hepático das LNPs.....	64
9. Entrega hepática simultânea de Cas9 mRNA/sgRNA em LNPs.....	64
10. Nota Final.....	67
Referências Bibliográficas .....	69
Anexos .....	78

# **Capítulo I**

## **Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica**

Laboratórios Basi – Indústria Farmacêutica S.A.

Sob a orientação da Dra. Cátia Augusto

## **Lista de Abreviaturas**

**AIM** – Autorização de Introdução no Mercado

**API** – *Active Pharmaceutical Ingredient*

**BCS** – Sistema de Classificação Biofarmacêutica

**CMA** – *Critical Material Attribute*

**CME** – Concentração Mínima Eficaz

**CMI** – Concentração Mínima Inibitória

**CQA** – *Critical Quality Attribute*

**CTD** – *Common Technical Document*

**FFUC** – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

**FHC** – *Future of Health Care*

**HPLC** – *High Performance Liquid Chromatography*

**IJM** – Unidade de Produção de Injetáveis

**I&D** – Investigação e Desenvolvimento

**LSM** – Unidade de Produção de Líquidos e Semi-sólidos

**PAR** – *Public Assessment Reports*

**QTPP** – *Quality Target Product Profile*

**RAD** – Relatório Abreviado de Desenvolvimento

**RCM** – Resumo das Características do Medicamento

**SWOT** – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

## **1. Introdução**

O estágio curricular oferece aos estudantes a oportunidade de, por uns meses, ter uma experiência no mundo laboral, previamente à entrada no mercado de trabalho. Este estágio define-se como um período de aprendizagem, de consolidação e aplicação de conhecimentos e de transição para uma realidade completamente distinta em termos de exigência e dinâmicas.

Acredito, por isso, que a realização deste estágio curricular é uma mais-valia para a formação de um Farmacêutico que, não só facilita a futura entrada no mundo profissional, como também permite ao estudante esclarecer eventuais dúvidas quanto ao setor em que pretende ingressar de entre as mais variadas saídas profissionais acessíveis a um Farmacêutico.

Por tudo isto, é de louvar o esforço da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), e respetivos docentes, e a disponibilidade das entidades que recebem, integram e orientam os estudantes, permitindo-lhes usufruir de uma oportunidade única e adquirir conhecimentos práticos que complementam a oferta formativa do curso.

A experiência, ao longo desta etapa tão diferenciada da formação de um estudante de Ciências Farmacêuticas, e as competências trabalhadas serão descritas neste relatório de estágio, orientado pela Dra. Cátia Augusto e decorrido nos Laboratórios Basi – Indústria Farmacêutica S.A, no departamento de Investigação e Desenvolvimento (I&D), no período de 10 de janeiro a 31 de março de 2022.

Enquadrando o estágio curricular, o departamento de I&D dos Laboratórios Basi divide-se em 2 vertentes, desenvolvimento farmacêutico e desenvolvimento de métodos e validação analítica, e 3 espaços, o *openspace* (área administrativa), o laboratório de I&D e o laboratório de desenvolvimento de métodos e validação analítica. O meu estágio decorreu, maioritariamente, no *openspace* do departamento, localizado na unidade de produção de Líquidos e Semi-sólidos (LSM).

## **2. Laboratórios Basi**

A empresa Laboratórios Basi – Indústria Farmacêutica S.A. iniciou a sua atividade em 1956, encontrando-se, atualmente, sediada em Mortágua, definindo-se como uma empresa que tem como missão o desenvolvimento, fabrico, comercialização e distribuição, a nível global, de medicamentos e produtos terapêuticos.

Em 2007, os Laboratórios Basi foram adquiridos e integrados num grupo farmacêutico, o grupo FHC (*Future of Health Care*), sendo, atualmente, uma Indústria Farmacêutica de capitais exclusivamente nacionais. Em 2011, foram transferidas as instalações de Coimbra para

Mortágua com a construção da unidade de produção de Líquidos e Semi-sólidos (LSM). Em 2019, foi concluída a construção e atribuída a autorização de fabrico para a unidade de produção de Injetáveis (IJM)<sup>1</sup>.

Os Laboratórios Basi possuem um portfólio de mais de 240 medicamentos registados, sob diversas formas farmacêuticas (sólidas, líquidas e semi-sólidas) e abrangendo 17 áreas terapêuticas, contando com uma presença em mais de 60 países distribuídos por 4 continentes<sup>2</sup>. No grupo FHC, onde se incluem os Laboratórios Basi, para além da FHC Farmacêutica, que se destina à disponibilização e gestão logística de medicamentos, dispositivos médicos e outros produtos de saúde, estão também integradas, atualmente, entidades como a Empifarma, empresa de distribuição farmacêutica, a Overpharma, empresa focada no fornecimento de produtos médicos e farmacêuticos a instituições prestadoras de cuidados de saúde, a Phagecon, empresa de consultoria farmacêutica, a Zeone Consulting, empresa de consultoria na área da informática, e a Laphysan, empresa sediada em Espanha dedicada à distribuição e comercialização de produtos farmacêuticos. A localização de algumas das empresas do grupo no Parque Industrial Manuel Lourenço Ferreira, em Mortágua, garante uma proximidade e fácil conexão entre as atividades destas empresas parceiras, rentabilizando o desempenho do grupo.

### **3. Análise SWOT**

O relatório de estágio, como solicitado pela FFUC, é redigido com base numa análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*). Assim, a análise SWOT consistirá no enquadramento de cada um destes tópicos na experiência do estágio curricular realizado.

#### **3.1. Pontos Fortes**

##### **3.1.1. Integração na empresa e ações formativas**

A integração na empresa foi, sem dúvida, um dos pontos fortes do estágio. No primeiro dia, foi-me feita uma apresentação da instituição e do restante grupo FHC. Posteriormente, fui entregue ao departamento de I&D, onde fui apresentado aos restantes elementos da equipa e onde pude ler o *general framework* do departamento, com o objetivo de ficar a conhecer as atividades por este departamento desenvolvidas, nomeadamente, e de forma simplista, desenvolvimento do produto, desenvolvimento do processo de fabrico (*scale-up*) e desenvolvimento de métodos e validação analítica. Adicionalmente, foi-me solicitada a leitura de *guidelines* que se revelariam importantes para o exercício do estágio, como a “*Guideline on the Investigation of Bioequivalence*”<sup>3</sup> e a “*Draft Guideline on Quality and Equivalence of Topical Products*”<sup>4</sup>. Solicitaram-me ainda a leitura de módulos 3.2.P.2 de diversos produtos, mais

concretamente, os módulos de uma solução injetável, de um gel e de uma suspensão oral, permitindo observar a aplicação prática de conceitos teóricos adquiridos ao longo do curso, assim como o resultado final das atividades do departamento.

Nos dias seguintes, decorreram ações de formação e visitas às instalações que tinham como objetivo apresentar regras, circuitos e políticas da empresa, de forma a que os estagiários estivessem habilitados a circular pelas diferentes áreas e pudessem desempenhar as tarefas que lhes viessem a ser propostas de forma mais independente.

Para além disso, a nível interno do departamento, foram ministradas formações mais específicas que visavam capacitar-me para a realização de atividades desenvolvidas pela equipa. A formação de Pesquisa de Mercado e Levantamento Bibliográfico, a formação relativa ao Desenvolvimento Farmacêutico (interno) de um produto e a formação relativa ao formato *Common Technical Document* (CTD) do *dossier* de Autorização de Introdução no Mercado (AIM) são exemplos de ações formativas que se revelaram essenciais à realização do estágio.

### **3.1.2. Tarefas propostas e autonomia na execução das mesmas**

O ponto forte que mais saliento deste estágio é a natureza e a diversidade das tarefas que me foram atribuídas. Para contextualização, o desenvolvimento interno de um produto, após avaliação preliminar, divide-se em 4 fases principais. Na fase 1 é realizada uma caracterização geral do produto que culmina com a elaboração do Relatório Abreviado de Desenvolvimento (RAD), que consiste no suporte/guia para o futuro desenvolvimento do produto. A fase 2 compreende o desenvolvimento farmacêutico (formulação e método de fabrico) e o desenvolvimento de métodos e validação analítica, ambas as atividades apoiadas pela informação obtida no decorrer da fase 1. A fase 3 consiste no desenvolvimento industrial, ou seja, no *scale-up* (transposição para a escala industrial), sendo produzidos, nesta fase, os lotes de validação e realizados estudos de estabilidade. São, então, redigidos os módulos do *dossier* de AIM ao encargo do departamento de I&D, nomeadamente, o 3.2.P.2 (*Pharmaceutical Development*), o 3.2.P.5.5 (*Characterisation of Impurities*) e o 3.2.P.5.6 (*Justification of Specifications*). Na fase 4 (registo) é submetido o *dossier* do produto e este é, após concessão de AIM, introduzido no mercado.

Ora, as tarefas que me foram atribuídas, ao longo do período de estágio, tendo em conta a sua diversidade e abrangência, permitiram compreender, na prática, como se processam as diferentes fases do desenvolvimento interno de um produto, uma vez que consistiam em tarefas integrantes dessas várias fases de desenvolvimento.

Para além disso, tive a possibilidade de realizar as tarefas que me eram propostas de forma independente, ainda que com total à vontade para o esclarecimento de eventuais dúvidas junto dos restantes colaboradores da equipa, o que considero que contribua para a estimulação de características essenciais a um profissional competente, como espírito de iniciativa, autodidatismo, resiliência, capacidade para ultrapassar dificuldades e proatividade. Uma vez terminadas as tarefas, estas eram revistas e corrigidas por elementos da equipa, realçando eventuais aspetos a melhorar, favorecendo a minha evolução ao longo do estágio.

## **3.2. Pontos Fracos**

### **3.2.1. Tempo de estágio**

Apesar da possibilidade de estagiar, cerca de 3 meses, numa Indústria Farmacêutica de renome, como os Laboratórios Basi, ser uma oportunidade única, que permite uma aprendizagem diferenciada e que, em simultâneo, possibilita um primeiro contacto com a realidade do mundo profissional, considero que é tempo insuficiente, tendo em conta o nível de exigência e a dinâmica deste setor. Um estágio mais duradouro permitiria uma maior consolidação de antigas e o desenvolvimento de novas competências, ficando a sensação de que, com um estágio de apenas 3 meses, este termina no momento em que começa a existir um maior entrosamento e uma maior “mecanização”, autonomia e rapidez na execução das diferentes tarefas.

### **3.2.2. Planificação do estágio**

A ausência de um plano de estágio previamente acordado com a FFUC pode ser fonte de alguma incerteza relativamente ao que o estudante será sujeito ao longo dos meses em que se encontra sob orientação da entidade acolhedora, podendo constituir uma potencial fonte de “tempos mortos”, e constituindo, simultaneamente, um fator limitante no momento da escolha dessa mesma entidade, por parte do aluno, e do estágio mais adequado ao perfil individual e gostos de cada um. No entanto, considerando os benefícios ímpares de um estágio deste carácter e a preocupação constante demonstrada pelos elementos do departamento, tal inexistência não se traduziu no impacto que poderia ser exetável. Para além disso, a ausência desse mesmo plano provou ser vantajoso, em determinados momentos, no decurso do meu estágio, uma vez que possibilitou a adequação das tarefas que me foram propostas às necessidades e/ou circunstâncias que foram surgindo, permitindo-me, por exemplo, ir várias vezes ao laboratório de I&D, ler e/ou tentar responder a pedidos de elementos de autoridades regulamentares. Adicionalmente, este carácter imprevisível contribui, ainda, para a criação de expetativas relativamente ao próximo desafio, sendo isso mais um fator de motivação.

### **3.2.3. Comunicação com a equipa**

A complexidade das atividades desenvolvidas ao nível da Indústria Farmacêutica, a sua divisão por diferentes departamentos e a dimensão da estrutura organizacional leva a que seja imprescindível uma adequada comunicação, inter- e intra-departamento, para um eficiente funcionamento de toda a organização. Observando o elevado nível de comunicação interpessoal demonstrado pelos diferentes colaboradores dos Laboratórios Basi, percebo agora que tal competência é fundamental para um adequado fluxo e partilha de informação, para a resolução de eventuais problemas e para a otimização do trabalho desenvolvido. Numa análise introspetiva, considero que este ponto é algo que tenho a melhorar para um desempenho mais eficiente no meu futuro exercício como profissional.

### **3.3. Oportunidades**

#### **3.3.1. Posicionamento do Farmacêutico ao nível da Indústria**

Tendo em conta a diversidade de funções que o farmacêutico pode desempenhar nas mais diversas vertentes, a realização de um estágio na Indústria Farmacêutica permite obter uma melhor perceção das funções e responsabilidades que são atribuídas ao Farmacêutico, neste setor, e da capacidade que este possui em cooperar e debater com profissionais de outros ramos da ciência, podendo acrescentar valor, sobretudo, em assuntos mais específicos do medicamento e da área regulamentar.

#### **3.3.2. Um estágio diferenciador**

Como já referido, este estágio oferece uma primeira experiência ao nível da Indústria Farmacêutica, previamente à entrada no mercado de trabalho, o que considero ser um fator diferenciador, para um futuro ingresso no setor. Considero que as tarefas que me foram inculcadas e as atividades do quotidiano que pude acompanhar conduziram ao desenvolvimento de aptidões e à aquisição de novas perceções que, de certo, serão extremamente úteis para o futuro. A título de exemplo, enumerarei algumas delas em diante.

##### **3.3.2.1. Pesquisa de Mercado (*Market Access*)**

Um dos primeiros passos do desenvolvimento interno do produto é realizar uma pesquisa de mercado e levantamento bibliográfico de medicamentos semelhantes ao que se pretende desenvolver, de acordo com a proposta de desenvolvimento definida (nos casos solicitados, de uma suspensão oral e de uma solução injetável). Esta pesquisa tem por objetivo recolher e compilar informações relevantes de outros produtos existentes, presentes em Resumos das Características do Medicamento (RCMs) ou *Public Assessment Reports* (PARs), tais como o mercado onde foi concedido AIM, a substância ativa, a dosagem, a forma

farmacêutica, a composição qualitativa e quantitativa, as apresentações e o material de acondicionamento, o prazo de validade, as condições de armazenamento, a posologia e o modo de administração, as indicações terapêuticas, o detentor de AIM e a data do primeiro AIM ou se foi registado como genérico. Toda esta informação é analisada e/ou alvo de comparação e incluída no RAD.

### 3.3.2.2. Relatório Abreviado de Desenvolvimento (RAD)

Na fase I do desenvolvimento interno do produto é elaborado o RAD (no caso que me foi proposto, de uma solução injetável), que inclui a informação obtida através da pesquisa de mercado, a informação de suporte ao desenvolvimento farmacêutico do produto e propostas a considerar para a realização do último. É apresentada uma proposta inicial de formulação (qualitativa e quantitativa), que pode recorrer, adicionalmente, a fontes como patentes, artigos científicos, o *Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations* ou *Draft Guidances*. Posteriormente, são enumerados uma série de comentários ou requisitos especiais relativamente ao produto a desenvolver. Por exemplo, no que toca à seleção da forma do *Active Pharmaceutical Ingredient* (API) mais adequada (de acordo com monografias de substância ativa e com a forma mais utilizada nos produtos do mercado), ao pH do produto acabado (mencionado em monografias de produto acabado, por exemplo), à estabilidade do API (oxidativa, fotolítica, térmica ou em função do pH), às impurezas do API e do produto acabado e/ou potencial existência de polimorfismo do API. A título de exemplo, as características de estabilidade do API permitem estabelecer propostas quanto ao pH mais indicado para o produto acabado, à necessidade de proteção em relação à luz, à necessidade de atmosfera de azoto no decurso do fabrico e ao método de esterilização mais adequado. São ainda identificados os pontos críticos do desenvolvimento do produto, considerando as suas características e as ações a realizar.

### 3.3.2.3. Módulo 3.2.P.2 (CTD) do *dossier* de AIM

Ao longo do estágio foi-me também proposto a elaboração das diversas secções do módulo 3.2.P.2, de dois produtos diferentes, nomeadamente duas soluções injetáveis, sendo que tive maior contacto com a secção 3.2.P.2.1.1 (*Drug Substance*), a secção 3.2.P.2.1.2 (*Excipients*) e a secção 3.2.P.2.2.1 (*Formulation Development*). A secção P.2.1.1 consiste na caracterização físico-química (solubilidade; coeficiente de partição; constante de dissociação; isomerismo e quiralidade; estabilidade; classe do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS); polimorfismo; etc...) e biológica (mecanismo de ação; farmacocinética; eficácia clínica; toxicidade) da substância ativa, sendo também feita uma análise da sua compatibilidade com

os excipientes da formulação. A secção P.2.1.2 consiste numa descrição qualitativa e quantitativa de todos os excipientes da formulação, a função que desempenham e a demonstração de que estão a ser utilizados para o propósito usual em formulações farmacêuticas e nas concentrações habituais, tendo em conta a forma farmacêutica. Na secção P.2.2.1 são definidos o *Quality Target Product Profile* (QTTP) e os *Critical Quality Attributes* (CQAs) do produto e ainda os *Critical Material Attributes* (CMAs) para uma adequada seleção da substância ativa e excipientes. Adicionalmente, é realizado o desenvolvimento da formulação propriamente dito, sustentado em informação bibliográfica e nos diversos testes e estudos realizados internamente.

#### 3.3.2.4. Laboratório I&D

As idas ao laboratório permitiram-me acompanhar e, depois, produzir, sob orientação, lotes laboratoriais de um creme com diferentes concentrações de conservante antimicrobiano, com o objetivo de responder a um pedido de elementos de uma autoridade regulamentar em que era solicitada a demonstração de que o conservante se encontrava na concentração mínima eficaz (CME) ou concentração mínima inibitória (CMI). Para além disso, foi-me apresentada a secção de estudos *in vitro* e feita uma introdução ao funcionamento da *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) e das células de difusão vertical (células *Hanson*, neste caso), assim como à utilidade destes equipamentos neste tipo de estudos. Estas experiências contribuíram para expandir a experiência obtida com o estágio.

#### 3.3.2.5. Pedidos de elementos

Com o surgimento, ao longo do estágio, de pedidos de elementos, por parte de autoridades regulamentares, foi-me dada a oportunidade de responder a 2 dos mesmos. Num deles, era solicitado, pelo avaliador, um relatório em que deveria ser feita uma avaliação de impurezas potencialmente mutagénicas, e respetivos controlos, de acordo com a *guideline* ICH M7<sup>5</sup>. No outro, era solicitada a demonstração de equivalência biofarmacêutica entre a formulação proposta pelo requerente e as formulações estabelecidas no mercado, de acordo com a *Guideline on the Investigation of Bioequivalence*<sup>3</sup>.

### 3.4. Ameaças

#### 3.4.1. Número de Farmacêuticos na Indústria

As competências adquiridas ao longo do MICF abrangem um grande número de áreas da ciência, o que pode ser benéfico, na medida em que expande as saídas profissionais do curso, no entanto, acaba por limitar o grau de qualificação/especialização em cada uma delas. Ora, num setor com esta exigência, embora o Farmacêutico tenha as bases para se adaptar e

desempenhar diversas funções, acaba por ser preterido em detrimento de outros profissionais com formação não tão abrangente, mas mais especializada, acabando estes por estarem mais capacitados para desenvolver atividades típicas da Indústria, de forma autónoma e sem necessidade de passar por formações adicionais, uma vez que já possuem o *know-how*.

### **3.4.2. Estágio de carácter opcional**

O plano curricular do MICF apenas determina um estágio curricular obrigatório em Farmácia Comunitária. Deste modo, os estudantes podem chegar a não ter oportunidade de estagiar em diferentes áreas no âmbito das saídas profissionais do Farmacêutico. O elevado número de horas mínimas de estágio em Farmácia Comunitária leva a que o estudante, caso pretenda ter as suas escolhas e prazos facilitados para o Estágio Curricular de 5º ano, deva realizar, previamente à entrada no 5º ano do MICF, um estágio de verão.

## **4. Considerações Finais**

Findo o estágio, resta agradecer à FFUC, pela oportunidade de estagiar no setor da Indústria Farmacêutica, aos Laboratórios Basi e, sobretudo, ao departamento de I&D, pela integração proporcionada e pelo estágio excecionalmente enriquecedor que, de certo, muito irá contribuir para a minha formação. Através de todas as tarefas propostas, foi possível adquirir uma perceção bastante clara das atividades desempenhadas por este departamento a quem tenha o privilégio de nele ingressar.

A oportunidade de integrar aquilo que é a realidade profissional de uma Indústria Farmacêutica de renome e em crescimento acarreta um carácter desafiante e consciencializa os estudantes para a exigente dinâmica de trabalho, para as responsabilidades de um colaborador e para a necessidade de formação contínua e desenvolvimento de novas competências. A oportunidade de observar estes profissionais no desempenho das suas responsabilidades são testemunhos de valor inigualável.

## Referências Bibliográficas

1. FHC - **A Nossa Atividade** - [Consult. 12 ago. 2022]. Disponível em: <https://www.fhc.pt/a-nossa-atividade>
2. BASI - **Destaques** - [Consult. 12 ago. 2022]. Disponível em: <https://www.basi.pt/highlights>
3. EMA, European Medicines Agency - **Investigation of Bioequivalence** - [Consult. 12 ago. 2022]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/investigation-bioequivalence>
4. EMA, European Medicines Agency - **Quality and equivalence of topical products** - [Consult. 12 ago. 2022]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/quality-equivalence-topical-products>
5. EMA, European Medicines Agency - **ICH M7 Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk** - [Consult. 12 ago. 2022]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m7-assessment-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit-potential>

# **Capítulo II**

## **Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária**

Farmácia S. Miguel

Sob orientação da Dra. Alexandra Albuquerque

## **Lista de Abreviaturas**

**ITU** – Infecções do Trato Urinário

**MICF** – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**MNSRM** – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

**MNSRM-EF** – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica de Venda Exclusiva em Farmácia

**MSRM** – Medicamento Sujeito a Receita Médica

**PCHC** – Produtos Cosméticos e de Higiene Corporal

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**SWOT** – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

## **I. Introdução**

A Farmácia Comunitária posiciona-se, cada vez mais, como um local de saúde fiável e de fácil acesso, garantindo a proximidade com a população e a promoção de saúde no seio da comunidade. Frequentemente, a farmácia é o primeiro local onde as pessoas se dirigem para obter aconselhamento e/ou esclarecer dúvidas, salientando a importância do farmacêutico e a confiança depositada, pela população, neste profissional. Considero que a realização de um estágio curricular em Farmácia Comunitária é, por isso, de grande relevância, uma vez que, nesta área, a experiência é fundamental para um excelente exercício da profissão.

Este relatório refere-se ao estágio que decorreu na Farmácia S. Miguel, no período de 4 de abril a 29 de julho de 2022, sob orientação da Dra. Alexandra Albuquerque, e visa transmitir a experiência no decurso do mesmo.

A vasta zona de atendimento da farmácia é composta por 4 balcões de atendimento. Ao longo de toda esta área encontram-se expostos diversos produtos, organizados por marcas, como produtos cosméticos e de higiene corporal (PCHC), veterinária, ortopedia, período pós-natal, etc. Atrás dos balcões, encontram-se expostos uma enorme variedade de produtos, dedicados às mais variadas afeções e organizados segundo as mesmas, incluindo medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM), medicamentos não sujeitos a receita médica de venda exclusiva em farmácia (MNSRM-EF), suplementos alimentares, etc. Esta zona inclui ainda um gabinete onde são prestados diferentes serviços, como a administração de injetáveis ou de vacinas, a medição da glicémia ou do perfil lipídico, podendo ainda ser utilizado em situações que careçam de maior privacidade. O *back office* é constituído por uma zona de receção e verificação de encomendas, um armazém, um gabinete destinado a consultas de nutrição, um laboratório, um escritório, uma cozinha e uma casa de banho.

## **2. Análise SWOT**

O relatório de estágio é redigido com base numa análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*). Assim, a análise SWOT consistirá no enquadramento de cada um destes tópicos na experiência do estágio curricular realizado.

### **2.1. Pontos Fortes**

#### **2.1.1. Equipa técnica**

Um dos aspetos que mais contribuiu para a rentabilização do estágio foi a excelente equipa técnica, da Farmácia S. Miguel, que me acompanhou. É uma equipa profissional, experiente, sábia, acolhedora, solidária e que se mostrou sempre disponível, não só para os utentes, como para me auxiliar em tarefas, me esclarecer dúvidas ou me oferecer pequenas

formações, sobre diversos produtos e/ou circunstâncias, que em muito contribuíram para um melhor desempenho, da minha parte, no aconselhamento em futuros atendimentos.

### **2.1.2. Aquisição e consolidação de conhecimentos**

A possibilidade de acompanhar atendimentos, e subsequentes aconselhamentos, realizados pelos membros da equipa técnica, assim como a possibilidade de esclarecer dúvidas junto dos mesmos perante determinada situação, é uma mais-valia para a formação de um estudante de Ciências Farmacêuticas, permitindo observar a aplicação prática de conhecimentos e adquirir novas noções. Após o meu estágio, considero que a experiência é um fator fundamental no âmbito da Farmácia Comunitária e que se traduz diretamente em maior sabedoria. Ao longo dos vários meses, a simples vivência neste meio e o facto de ser confrontado com as mais distintas situações traduziram-se na consolidação e aquisição de uma variedade de conhecimentos que muito dificilmente seriam obtidos por outra via.

## **2.2. Pontos Fracos**

### **2.2.1. Preparação potencialmente insuficiente em determinadas áreas do saber**

Embora o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) seja um curso bem estruturado e ofereça uma excelente preparação para as diversas saídas profissionais de um farmacêutico e sabendo de antemão que é impossível acautelar, com a oferta formativa, todas as situações do exercício profissional em determinada área e que os estágios curriculares servem esse propósito, considero que determinadas unidades curriculares teriam maior utilidade se dotadas de uma componente prática mais preponderante. Durante o estágio e ao longo de diferentes atendimentos, fui colocado em situações para as quais não me sentia tão capaz de realizar um adequado aconselhamento farmacêutico, sobretudo no âmbito da veterinária, mas, por vezes, também da dermofarmácia e cosmética.

O propósito de um curso como o de MICF não é ser limitado ao ponto de acautelar situações tão específicas e esporádicas, mas sim o de conferir bases que permitam ainda assim resolver essas situações ou que permitam facilmente adquirir os conhecimentos para tal. No entanto, considero que uma maior vertente prática ou uma componente teórica com maior correlação com o futuro profissional da generalidade dos alunos, seria vantajoso em detrimento de uma formação excessivamente teórica e com reduzida utilidade.

## **2.3. Oportunidades**

### **2.3.1. Requisição de um medicamento sujeito a receita médica (MSRM)**

Ao longo do estágio foram inúmeras as vezes em que utentes solicitaram a dispensa de um medicamento sujeito a receita médica (MSRM), mesmo sem indicação médica ou sem se encontrarem na posse de referido documento. Esta situação, na minha opinião, abre uma janela de oportunidade para o farmacêutico ser proativo e aplicar todo o seu conhecimento na sugestão de alternativas válidas, seguras, eficazes e, eventualmente, mais adequadas à circunstância do utente. Esta situação contribui, de igual forma, para a consolidação do saber em diferentes vertentes, no seguimento do estudante ser confrontado com as mais variadas situações e/ou questões. Com as perguntas certas, o farmacêutico poder-se-á inteirar de toda a situação que sustenta o pedido de determinado MSRM (e não só). A obtenção de informações acerca da afeção em causa e do objetivo que o utente pretende ver alcançado com a utilização do medicamento são essenciais para, por exemplo, aconselhar a sua eventual não utilização ou para a sugestão de alternativas mais vantajosas.

### **2.3.2. Interação com utentes de perfis farmacoterapêuticos variados**

O elevado número de atendimentos dá azo a que o estudante possa colocar em prática conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do curso. Perante questões ou incertezas dos utentes foi possível colocar diariamente em prática a formação teórica fornecida pelo MICF, por exemplo, no que toca à indicação terapêutica de certo medicamento, posologia e modo de administração do mesmo, possíveis efeitos adversos e interações medicamentosas. Para além disso, muitas vezes, por simples análise da medicação realizada por determinado utente, que permitia ainda obter informações sobre a sua história clínica, era possível direcionar o aconselhamento para as melhores opções, tendo em conta o perfil individual do utente.

## **2.4. Ameaças**

### **2.4.1. MNSRM, produtos de saúde e bem-estar**

A venda de medicamentos não sujeitos a receita médica e de suplementos noutros pontos de venda que não as farmácias, como em plataformas *online*, representa uma problemática, não só do ponto de vista económico para as farmácias, como de um ponto de vista de saúde pública. A problemática económica prende-se com o facto de estas cadeias apresentarem um elevado volume de compras, obtendo descontos que lhes permitem praticar preços que não oferecem às farmácias oportunidade de competir. Mas mais preocupante são os potenciais problemas de saúde decorrentes da toma destes produtos sem considerar, ou simplesmente por desconhecer, as consequências que daí poderão resultar.

Qualquer medicamento, por mais seguro que seja, apresenta riscos associados à sua toma, como tal, deve ser sempre considerada a relação benefício-risco, perante determinado doente e determinada situação. Os MNSRMs não são exceção e a sua venda livre potencia situações de auto-medicação que, sem consideração pelo contexto do doente (história clínica e medicação concomitante) e sem possibilidade de intervenção farmacêutica, podem resultar em efeitos adversos e/ou eventos clínicos graves.

Para além disso, o potencial nefasto dos suplementos alimentares, sobretudo na forma de interações com os medicamentos, e a correta utilização dos mesmos para que seja possível a obtenção de resultados em saúde positivos, são ainda alvo de elevada desconsideração. A elevada propensão para interações com os medicamentos é cada vez mais um dado adquirido.

### **3. Casos Práticos**

#### **3.1. Caso Prático I: Infecção Urinária**

Utente do sexo feminino, na casa dos 20 anos, desloca-se à farmácia com queixas de desconforto urinário e ardor no momento da micção. Refere ainda que as queixas duram há menos de um dia e que denotou uma necessidade urgente de urinar. O relato da utente levanta suspeitas de um quadro inicial de sintomas de uma infecção urinária.

Tratando-se de uma situação mais prevalente em mulheres (devido ao menor comprimento da uretra feminina e proximidade do meato urinário à vagina e ânus)<sup>1</sup>, pontual (no momento do atendimento) e sem evidência de hematúria, sugeri Advancis Urivial SOS<sup>®</sup>. Este produto é um suplemento alimentar com alto teor em vitamina B6 e uma fórmula concentrada com plantas de uso tradicional. A vitamina B6 contribui para o normal funcionamento do sistema imunitário<sup>2</sup>. A uva-ursina apresenta propriedades antibacterianas que se devem à hidroquinona<sup>3</sup>. O urze apresenta compostos fenólicos com propriedades antibacterianas<sup>4</sup>. A bétula e a cavalinha apresentam propriedades diuréticas, aumentando o volume urinário e a remoção de agentes patogénicos<sup>5</sup>. O mirtilo apresenta componentes, como as proantocianidinas, que inibem a adesão das fímbrias das bactérias ao urotélio, sendo indicado para a prevenção de infeções do trato urinário<sup>6</sup>.

No entanto, o Advancis Urivial SOS<sup>®</sup> apresenta-se sob a forma de ampolas bebíveis, tendo a utente demonstrado preferência por uma forma farmacêutica sólida. Como tal, recomendei-lhe o Cistisil<sup>®</sup> ou o Systelle<sup>®</sup>. O Cistisil<sup>®</sup> apresenta na sua formulação, para além de cavalinha e uva ursina, arando vermelho, que, por ação da frutose e proantocianidinas, inibe a adesão bacteriana ao urotélio, sendo indicado na prevenção de infeções do trato urinário (ITU)<sup>6</sup>. O Systelle<sup>®</sup> é uma formulação à base de uva ursina. A utente acabou por optar pelo

Systeme<sup>®</sup>, tendo-lhe então indicado a toma de 2 comprimidos, 3 vezes ao dia, preferencialmente com alimentos, durante sete dias<sup>7</sup>. Recomendei que se deslocasse ao médico em caso de agravamento dos sintomas ou ausência de melhoria no prazo de poucos dias. Como medidas não-farmacológicas, recomendei aumentar o consumo de água, evitar o uso de pensos diários e de roupa interior justa ou sintética e não retardar a micção.

### 3.2. Caso Prático 2: Tosse Seca

Utente desloca-se à farmácia com o objetivo de lhe ser aconselhado um medicamento para a tosse do filho de 17 anos. Após ser questionado, o utente refere que se trata de uma tosse seca, que teve início há dois dias, e que o filho não tem problemas de saúde conhecidos. Como tal, fiz-lhe uma primeira recomendação de Bisoltussin Tosse Seca<sup>®</sup>. O princípio ativo é o dextromorfano, um antitússico de ação central não estupefaciente, que atua por depressão do centro da tosse ao nível do Sistema Nervoso Central (SNC)<sup>8</sup>. No entanto, ao longo do estágio apercebi-me que as pessoas tinham, por vezes, dificuldade em distinguir uma tosse seca de uma tosse produtiva em que não se consegue libertar a expetoração, sobretudo quando a medicação não se destinava ao adquirente. Perante uma tosse produtiva, a inibição do reflexo da tosse pelo antitússico poderia potenciar o desenvolvimento de uma pneumonia. Como tal, para acautelar esta situação, fiz uma segunda recomendação de GrinTuss Adulto<sup>®</sup>, que está indicado para situações de tosse seca e produtiva a partir dos 12 anos<sup>9</sup>.

O GrinTuss Adulto<sup>®</sup> é um dispositivo médico, visto que o principal mecanismo é mecânico/físico, devido à presença de compostos demulcentes, como o mel e complexos moleculares de resinas, polissacarídeos, saponinas e flavonóides de tanchagem, grindélia e helicriso, embora apresentem também atividade farmacológica. Atua como calmante da tosse através da formação de uma película protetora que adere à mucosa orofaríngea (efeito barreira), evitando o contacto de agentes irritantes com recetores do trato respiratório, apresentando ainda uma ação lubrificante<sup>10</sup>. Para além disso, pode atuar ao nível da tosse produtiva uma vez que apresenta, na sua formulação, compostos com ação expetorante e mucorreguladora da grindélia e helicriso, que também auxiliam na formação da película protetora e calmante ao nível da faringe<sup>10</sup>.

Depois de explicar o modo de ação do GrinTuss Adulto<sup>®</sup> e a sua dupla utilidade, o utente acabou por optar por este medicamento. Como tal, recomedei-lhe a toma de 10 mL, 2 a 4 vezes ao dia<sup>9</sup>, e que dirigisse o filho ao médico caso a tosse persista por uma duração superior a 1 semana. Recomendei ainda evitar o contacto com substâncias potencialmente irritantes, como fumo e pó, uma ingestão de água abundante e realizar a última toma diária do GrinTuss Adulto<sup>®</sup> perto da hora de deitar.

### 3.3. Caso Prático 3: Aftas

Utente do sexo masculino, na casa dos 30 anos, recorre à farmácia com queixa de aftas em elevado número na cavidade oral. Tendo em conta a ausência de medicação e patologias concomitantes relevantes para a situação, mostrei ao utente o Aloclair Plus® Gel Oral e o Aloclair Plus® Solução Bucal, recomendando de preferência a solução bucal visto que o utente refere numerosas lesões. O Aloclair Plus® é um dispositivo médico com polímeros na sua composição, como a polivinilpirrolidona (polímero hidrofílico com propriedades mucoadesivas e filmogénicas), e que atua por formação de uma película protetora que adere à mucosa oral, oferecendo assim uma barreira mecânica que protege as zonas afetadas e que alivia a dor ao evitar a exposição de terminações nervosas<sup>11</sup>. O ácido hialurónico, não só auxilia na formação deste filme, como também promove a cicatrização das lesões<sup>11</sup>. A aloé vera auxilia também no processo de cicatrização. O ácido glicirretínico apresenta propriedades anti-inflamatórias<sup>11</sup>. No entanto, após ter explicado o modo de ação do Aloclair Plus®, o utente refere que já experimentou produtos com o mesmo propósito e que a utilização destes não teve resultado.

Perante esta informação, questiono o utente quanto à aparência das lesões, mais concretamente se estas se apresentam com uma aparência esbranquiçada. O utente responde afirmativamente (algo que foi também confirmado visualmente), o que me leva a suspeitar de uma possível infeção oportunista por *Candida albicans*. Com base nessa observação, refiro ao utente que poderá vir a ser uma situação que exija observação médica, mas que poderia utilizar Mycostatin®, cujo princípio ativo é a nistatina. A nistatina exerce a sua ação antifúngica (fungistática e fungicida) através da alteração da permeabilidade da membrana do fungo, levando à saída de componentes intracelulares e, ultimamente, à morte do fungo<sup>12</sup>. Recomendo ao utente a realização de bochechos com o Mycostatin®, durante uns minutos, e, de seguida, a deglutição da suspensão oral, 4 vezes ao dia, durante pelo menos 1 semana<sup>13</sup>. No entanto, volto a reforçar a ideia da ida ao médico, sobretudo se não houver melhoria dos sintomas ou se estes se agravarem, uma vez que poderá ser necessário tratamento com um antifúngico como o fluconazol. Como medidas não farmacológicas, recomendei evitar comidas ricas em açúcar, uma higiene oral adequada e cessação tabágica, se for caso disso.

### 3.4. Caso Prático 4: Doença Hemorroidária

Utente do sexo feminino, na casa dos 40 anos, com queixas de prurido e dor na região anal, que provocam um grande desconforto e incómodo e que suspeita tratar-se de um quadro de hemorróidas, referindo que frequentemente apresenta dificuldade em defecar (obstipação) e fezes de consistência dura. Após questionar a utente, passo a suspeitar de doença hemorroidária externa, sem presença de sangue nas fezes. Como tal, recomendo-lhe o Faktu®,

com os princípios ativos policresuleno e cinchocaína, 2 a 3 vezes ao dia, durante sete dias<sup>14</sup>. O policresuleno atua como antisséptico e hemostático local, originando a contração dos pequenos vasos<sup>14</sup>. A cinchocaína é um anestésico local, aliviando a dor e o prurido<sup>14</sup>.

Considerando os sintomas de obstipação mencionados pela utente, e que o esforço defecatório pode exacerbar a doença hemorroidária, recomendei adicionalmente o DulcoSoft<sup>®</sup>, um laxante osmótico. Trata-se de um dispositivo médico com macrogol 4000, um polímero hidrofílico linear de elevado peso molecular, não absorvível e não metabolizável, que retém água através do estabelecimento de ligações de hidrogénio, aumentando o volume do fluido intestinal e, assim, estimulando o peristaltismo intestinal e amolecendo as fezes<sup>15</sup>. Existem 2 apresentações do DulcoSoft<sup>®</sup>, solução oral e pó para solução oral, tendo a utente optado pelo pó para solução oral. Recomendei-lhe, inicialmente, a toma de 1 saqueta, de preferência pela manhã, ou, posteriormente e caso seja necessário, 2 saquetas, preferencialmente em dose única pela manhã<sup>16</sup>.

Como medidas não farmacológicas, recomendei o aumento da ingestão de fluidos e fibras, não retardar a defecação, diminuir a ingestão de substâncias irritantes para a mucosa, como especiarias e álcool, fazer uma limpeza adequada da região anal, fazer banhos de assento em água tépida ou com água fria, em situações de crise.

### **3.5. Caso Prático 5: Cólicas abdominais**

Utente do sexo masculino, na casa dos 30 anos, dirige-se à farmácia reportando um quadro de fortes cólicas abdominais, tendo também reportado duas dejeções diarreicas no dia anterior. Após uma conversa com o utente, percebi que se tratava de uma situação aguda e sem história clínica aparente (e.g. viagens recentes) ou toma de medicação que justificasse o quadro de sintomas.

Assim, para as cólicas, aconselhei a toma do Buscopan<sup>®</sup> ou Buscopan<sup>®</sup> Compositum N. O princípio ativo do Buscopan<sup>®</sup> é a butilescopolamina que, devido à sua ação anticolinérgica, atua como espasmolítico sobre a musculatura do aparelho gastrointestinal<sup>17</sup>. Adicionalmente, o Buscopan<sup>®</sup> Compositum N, ao qual dei preferência neste atendimento, apresenta na sua composição paracetamol, sendo útil em casos de cólicas com dor acentuada devido à sua ação analgésica<sup>17</sup>. O utente acabou por aceitar a recomendação do Buscopan<sup>®</sup> Compositum N. Como tal, aconselhei a toma de 1 a 2 comprimidos, 3 vezes ao dia, não excedendo os 6 comprimidos por dia, para que a dose de paracetamol não ultrapasse as 3 g diárias<sup>17</sup>.

Para a diarreia, existe a possibilidade da toma, por exemplo, de prebióticos e/ou probióticos, de forma a re-equilibrar a flora intestinal, ou do Imodium Rapid<sup>®</sup>, com o princípio

ativo loperamida e na forma farmacêutica de comprimido orodispersível, que favorece a rapidez de ação. A loperamida é um agonista opióide da parede intestinal, diminuindo o peristaltismo e aumentando o tempo de trânsito intestinal<sup>18</sup>. Para além disso, aumenta o tónus do esfíncter anal, reduzindo a incontinência<sup>18</sup>. No entanto, a associação de butilescopolamina e de loperamida pode, em teoria, resultar numa situação de obstipação. Tendo em conta que o doente, no dia do atendimento, referiu não ter tido dejeções diarreicas e pela possibilidade de ter sido uma situação pontual, acabei por transmitir ao utente a opção de associar, à butilescopolamina, um probiótico, como o Prolif<sup>®</sup>, que contém *Saccharomyces boulardii* e pode ser tomado 1 a 3 vezes por dia<sup>19</sup>. Depois de apresentar as 2 opções ao utente, este acabou por optar pelo Buscopan<sup>®</sup> Compositum N e Prolif<sup>®</sup>, visto que a queixa principal se prendia com as dolorosas cólicas.

A diarreia é geralmente uma situação auto-limitada e o tratamento mais importante é assegurar a reposição de fluidos e eletrólitos, de forma a prevenir uma situação de desidratação. Como tal, recomedei a toma de 1 saqueta, em 200 mL de água, de Dioralyte<sup>®</sup>, uma formulação de eletrólitos e glucose, caso a situação de diarreia permanecesse<sup>20</sup>. Como o utente não aceitou a recomendação, voltei a frisar a importância de uma hidratação adequada e, se possível, a reposição de eletrólitos, sobretudo se a situação de diarreia permanecer. Alertei ainda para a necessidade de consulta médica caso a diarreia não resolva espontaneamente no prazo de uns dias.

#### **4. Considerações Finais**

A experiência vivida ao longo do estágio em Farmácia Comunitária salienta a necessidade do farmacêutico se manter em constante atualização técnica e científica, tendo em conta que a população recorre cada vez mais a este profissional, a necessidade de não trair essa confiança pela qual se tem trabalhado tanto nos últimos anos e a diversidade de situações com as quais o farmacêutico é confrontado no quotidiano. Adicionalmente, conferiu-me conhecimentos práticos únicos, que sustentariam um futuro ingresso na área com melhor desempenho e que reduziriam substancialmente o período de adaptação.

## Referências Bibliográficas

1. AYDIN, Abdullatif *et al.* - Recurrent urinary tract infections in women. **International Urogynecology Journal**. ISSN 0937-3462. 26:6 (2015) 795–804. doi: 10.1007/s00192-014-2569-5.
2. RAIL, Laura C.; MEYDANI, Simin Nikbin - Vitamin B6 and Immune Competence. **Nutrition Reviews**. ISSN 17534887. 51:8 (1993) 217–225. doi: 10.1111/j.1753-4887.1993.tb03109.x.
3. YARNELL, Eric - Botanical medicines for the urinary tract. **World Journal of Urology**. ISSN 0724-4983. 20:5 (2002) 285–293. doi: 10.1007/s00345-002-0293-0.
4. VUČIĆ, Dragana M. *et al.* - In vitro activity of heather [*Calluna vulgaris* (L.) Hull] extracts on selected urinary tract pathogens. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**. ISSN 1840-4812. 14:4 (2014) 234. doi: 10.17305/bjbms.2014.4.40.
5. DAS, Sarita - Natural therapeutics for urinary tract infections—a review. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**. ISSN 2314-7253. 6:1 (2020) 64. doi: 10.1186/s43094-020-00086-2.
6. HISANO, Marcelo *et al.* - Cranberries and lower urinary tract infection prevention. **Clinics**. ISSN 18075932. 67:6 (2012) 661–667. doi: 10.6061/clinics/2012(06)18.
7. TILMAN - **Systelle** [Consult. 9 ago. 2022]. Disponível em: <https://tilmanportugal.com.pt/systelle>
8. PUBCHEM - **Dextromethorphan** [Consult. 9 ago. 2022]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dextromethorphan>
9. ABOCA - **Grintuss Adult Xarope** [Consult. 9 ago. 2022]. Disponível em: <https://www.aboca.com/pt-pt/produto/grintuss-adult-xarope>
10. CANCIANI, Mario *et al.* - Efficacy of Grintuss® pediatric syrup in treating cough in children: a randomized, multicenter, double blind, placebo-controlled clinical trial. **Italian Journal of Pediatrics**. ISSN 1824-7288. 40:1 (2014) 56. doi: 10.1186/1824-7288-40-56.
11. KAPOOR, Pranav; SACHDEVA, Shabina; SACHDEVA, Silonie - Topical hyaluronic Acid in the management of oral ulcers. **Indian journal of dermatology**. ISSN 1998-3611. 56:3 (2011) 300–2. doi: 10.4103/0019-5154.82485.
12. SANTOS, A. G. DOS *et al.* - The molecular mechanism of Nystatin action is dependent

on the membrane biophysical properties and lipid composition. **Physical chemistry chemical physics: PCCP**. ISSN 1463-9084. 19:44 (2017) 30078–30088. doi: 10.1039/c7cp05353c.

13. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento: Mycostatin** [Consult. 9 ago. 2022]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

14. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento: Faktu** [Consult. 10 ago. 2022]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

15. LYSENG-WILLIAMSON, Katherine A. - Macrogol (polyethylene glycol) 4000 without electrolytes in the symptomatic treatment of chronic constipation: a profile of its use. **Drugs & Therapy Perspectives**. ISSN 1172-0360. 34:7 (2018) 300–310. doi: 10.1007/s40267-018-0532-0.

16. DULCOLAX - **Dulcosoft** [Consult. 10 ago. 2022]. Disponível em: <https://www.dulcolax.pt/dulcosoft>

17. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento: Buscopan Compositum N** [Consult. 10 ago. 2022]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

18. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento: Imodium Rapid** [Consult. 10 ago. 2022]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

19. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento: Prolif** [Consult. 10 ago. 2022]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

20. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento: Dioralyte** [Consult. 10 ago. 2022]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

# **Capítulo III**

## **Monografia**

**“CRISPR/Cas9 e Nanopartículas Lipídicas: Uma Parceria Para O  
Futuro”**

Sob a orientação do Professor Doutor João Nuno Sereno de Almeida Moreira

## **Lista de Abreviaturas**

**A** – Adenina

**ABE** – *Adenine Base Editor*

**APOBEC1** – subunidade I da desaminase do mRNA da apolipoproteína B

**APOE** – Apolipoproteína E

**BE** – *Base Editor*

**BER** – Reparação por Excisão de Bases

**C** – Citosina

**Cas** – *CRISPR-associated*

**Cas9** – *CRISPR-associated protein 9*

**CBE** – *Cytosine Base Editor*

**CMV** – Citomegalovírus

**CRISPR** – *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

**crRNA** – *CRISPR RNA*

**dCas9** – *dead Cas9*

**DODAP** – 1,2-dioleoil-3-dimetilamónio-propano

**DOPC** – Dioleoilfosfatidilcolina

**DOPE** – Dioleoilfosfoetanolamina

**DSB** – *Double-stranded Break*

**DSPC** – Diestearoilfosfatidilcolina

**G** – Guanina

**GOLD** – *Genome-editing Optimized Locked Design*

**HDR** – *Homology-directed Repair*

**HITI** – *Homology-Independent Targeted Insertion*

**hp-sgRNA** – *Hairpin sgRNA*

**IVT** – Transcrição *In Vitro*

**KRAB** – *Krueppel-associated box*

**LNP** – Nanopartícula Lipídica

**M** – 2'-O-metil

**MHC** – Complexo Major de Histocompatibilidade

**MMR** – *Mismatch Repair*

**MS** – 2'-O-metil 3' fosforotioato

**MSP** – 2'-O-metil 3' tiofosfonoacetato

**nCas9** – *Cas9 nickase*

**NHEJ** – *Non-homologous End Joining*

**NLC** – Transportador Lipídico Nanoestruturado

**OTE** – Efeito *Off-target*

**PAM** – *Protospacer Adjacent Motif*

**PBS** – *Primer Binding Site*

**PCSK9** – *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*

**PE** – *Prime Editor*

**PEG** – (Poli)etilenoglicol

**pegRNA** – *Prime Editing Guide RNA*

**pre-crRNA** – *pre-CRISPR RNA*

**PRR** – Recetor de Reconhecimento de Padrões

**RES** – Sistema reticuloendotelial

**RLUC** – luciferase da *Renilla*

**RNP** – Ribonucleoproteico

**SAR** – Relações Estrutura-Atividade

**sgRNA** – *Single Guide RNA*

**SLN** – Nanopartícula Lípida Sólida

**SNP** – Polimorfismo de Nucleótido Único

**SORT** – *Selective Organ Targeting*

**SpCas9** – *Streptococcus pyogenes Cas9*

**SSB** – *Single-stranded Break*

**ssDNA** – DNA de cadeia simples

**ssOGN** – Oligonucleótido de cadeia simples

**SV40** – Vírus Símio 40

**T** – Timina

**TadA** – Adenosina desaminase do RNA transferência

**TALEN** – *Transcription Activator-like Effector Nuclease*

**TCR** – Recetor de Células T

**tdTomato** – *Tandem Dimer Tomato*

**TERT** – Transcriptase Reversa Telomerase

**tracrRNA** – *trans-activating CRISPR RNA*

**tru-sgRNA** – sgRNA truncado

**TTR** – Transtirretina

**UGI** – Inibidor da Uracilo N-glicosilase

**UNG** – Uracilo N-glicosilase

**UPII** – Uroplaquina II

**wtCas9** – *Cas9 wild-type*

**wtTadA** - *tRNA adenine deaminase wild-type*

**ZAL** – *Zwitterionic Amino Lipid*

**ZFN** – *Zinc Finger Nuclease*

## **Resumo**

Desde a sua introdução, a terapia génica tem avançado a um ritmo fascinante e apresenta o potencial para revolucionar a medicina e a nossa perspetiva sobre doenças previamente consideradas incuráveis. Com as primeiras terapias aprovadas e um número cada vez maior destas em investigação clínica, poder-se-á assumir que a era da terapia génica já começou e está para ficar. Neste contexto, a CRISPR/Cas9 apresenta-se como um dos executantes mais relevantes e o conhecimento cada vez mais aprofundado dos seus componentes e modo de ação tem permitido uma melhoria significativa da eficácia e segurança do sistema. Suportada pelos avanços recentes na área dos vetores sintéticos, o sistema de entrega tornar-se-á cada vez mais simples e eficaz e poderá permitir a aplicação da capacidade de edição genómica da CRISPR/Cas9, virtualmente, a qualquer região do genoma.

Nesta dissertação são apresentadas ferramentas CRISPR/Cas9 e estratégias sustentadas nas mesmas, assim como avanços na sua entrega por nanopartículas lipídicas, que colocam a transposição clínica da CRISPR/Cas9 no horizonte.

**Palavras-chave:** CRISPR/Cas9; inovações moleculares; entrega; LNPs; mRNA.

## **Abstract**

Since its inception, gene therapy has advanced at a fascinating rate and has the potential to revolutionize medicine and our perspective on diseases previously held as incurable. With the first approved therapies and a progressively higher number of these in clinical investigation, it can be assumed that the era of gene therapy has begun and is here to stay. In this context, CRISPR/Cas9 presents itself as one of the most relevant players and the growing knowledge of its components and mechanism of action has enabled a significant improvement of the system's efficacy and safety. Supported by recent advances in synthetic vectors, the system's delivery will become increasingly simpler and effective and may allow CRISPR/Cas9's editing ability to be applied virtually anywhere in the genome.

This dissertation presents the CRISPR/Cas9 toolbox and strategies based on it, as well as breakthroughs on its delivery by lipid nanoparticles, that place CRISPR/Cas9's clinical translation on the horizon.

**Keywords:** CRISPR/Cas9; molecular innovations; delivery; LNPs; mRNA.

## I. Introdução ao sistema CRISPR/Cas9

CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) consiste num mecanismo de imunidade adaptativa, presente em organismos procariotas, como bactérias, que confere memória imunológica contra elementos genéticos móveis, como vírus (fagos) e plasmídeos, através da clivagem do genoma exógeno<sup>1</sup>. Os sistemas CRISPR/Cas encontram-se divididos em duas classes e cada classe engloba diferentes tipos e subtipos de sistemas<sup>1</sup>. Os sistemas CRISPR/Cas de classe I empregam múltiplas proteínas Cas no complexo efetor, enquanto que os sistemas de classe 2 empregam uma única proteína Cas dotada de vários domínios nuclease<sup>2</sup>. CRISPR/Cas9 é um sistema do tipo II pertencente à classe 2<sup>1</sup>.

O *CRISPR locus* inclui os *CRISPR-associated genes* (*Cas genes*) e o *CRISPR array*, isto é, repetições palindrômicas curtas (elementos repetitivos não codificantes) espaçadas entre si por pequenas sequências variáveis, os *spacers*<sup>3</sup>. Estes *spacers* derivam de fragmentos genómicos de fagos ou plasmídeos invasores, designados por *protospacers*, conferindo, assim, memória imunológica<sup>3</sup>. No genoma do patógeno invasor, os *protospacers* são seguidos pelo *protospacer adjacent motif* (PAM), sendo este específico para cada nuclease Cas e essencial para uma discriminação *self/non-self* e para um futuro reconhecimento de alvos<sup>3</sup>.

### I.1. Componentes e Mecanismo de corte do DNA

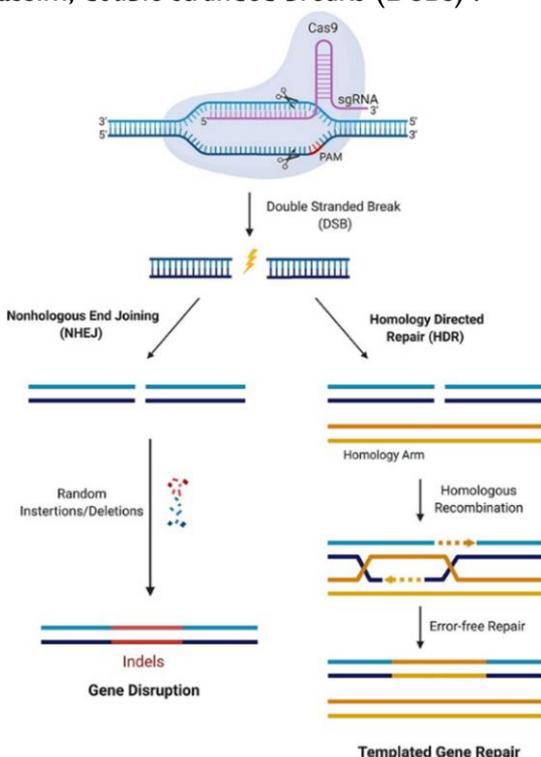
O *CRISPR array*- repetições e *spacers*- é transcrito a *pre-CRISPR RNA* (pre-crRNA), sendo depois processado a *CRISPR RNA* (crRNA), com o auxílio de proteínas Cas codificadas pelos *Cas genes* ou, no caso do sistema tipo II, após estabelecimento de um *duplex* com o *trans-activating CRISPR RNA* (tracrRNA) e clivagem da estrutura resultante pela endonuclease Rnase III, na presença da Cas9<sup>2</sup>. Posteriormente, o híbrido crRNA:tracrRNA associa-se à nuclease Cas9, formando o complexo ribonucleoproteico (RNP)<sup>4</sup>.

O sistema CRISPR/Cas9 é, então, constituído por uma nuclease Cas9, sendo a mais estudada e caracterizada proveniente da bactéria *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), e duas moléculas de RNA não codificantes, crRNA e tracrRNA, que podem ser fundidas, através de um *tetraloop* artificial, numa única molécula, o *single guide RNA* (sgRNA)<sup>2</sup>.

A caracterização estrutural do complexo RNP permitiu distinguir dois lóbulos da Cas9, o lóbulo de reconhecimento (lóbulo REC) e o lóbulo nuclease (lóbulo NUC)<sup>4</sup>. O lóbulo NUC consiste no domínio de interação com o PAM (*PAM-interacting domain*) e nos dois domínios nuclease, HNH e RuvC<sup>4</sup>. O lóbulo REC, dotado de vários domínios, está envolvido no reconhecimento do *heteroduplex* RNA:DNA<sup>4</sup>. O crRNA, através do *spacer* de 20 nucleótidos (nt), é responsável pelo reconhecimento da sequência complementar de DNA (ou

*protospacer*), enquanto que o *tracrRNA*, específico do sistema tipo II, é essencial não só para o processamento do *pre-crRNA* a *crRNA*, como também para o estabelecimento do complexo RNP, ao atuar como ponto de ligação para a *Cas9*<sup>5</sup>. O *sgRNA* é, então, constituído por uma região constante, na extremidade 3', e um *spacer/sequência-guia* na extremidade 5', geralmente de 17 a 20 nt, complementar ao DNA-alvo<sup>6</sup>.

Após estabelecimento do complexo RNP, a *Cas9* pesquisa o DNA em busca do PAM que, no caso da *SpCas9*, consiste num trinucleótido 5'-NGG-3'<sup>2</sup>. Em caso de reconhecimento e ligação ao mesmo, esta induz a separação local da dupla cadeia de DNA a montante do PAM<sup>7</sup>. A desnaturação do DNA permite um primeiro emparelhamento de bases entre o *spacer* do *crRNA* e a sequência-alvo<sup>7</sup>. Perante um emparelhamento bem sucedido, a desnaturação do DNA e hibridização do *crRNA* prosseguem em direção à região distal ao PAM (5'), resultando na formação do *R-loop*<sup>7</sup>. No decorrer deste processo, a presença de *mismatches*, na extremidade 3' (proximal ao PAM), entre o *protospacer* e o *spacer* do *crRNA*, interrompe de imediato o mecanismo de interrogação do DNA<sup>7</sup>. O estabelecimento de suficientes ligações *Watson-Crick*, entre o *crRNA* e o DNA-alvo, e a interação de cargas positivas do *nt-groove* da nuclease com a cadeia não complementar de DNA, permitem a formação e estabilizam o *R-loop*<sup>7</sup>. Por sua vez, este permite a ativação conformacional da nuclease e, conseqüentemente, a indução da quebra de ambas as cadeias de DNA (Figura 1), geralmente entre o 3º e o 4º nt a montante do PAM, por ação dos 2 domínios catalíticos da *Cas9*, HNH e RuvC, que clivam a cadeia de DNA complementar ao *crRNA* e a não complementar, respetivamente, originando, assim, *double-stranded breaks (DSBs)*<sup>2</sup>.



**Figura 1** - Reparação da DSB em células eucariotas. Adaptado de ref. (12)

## 1.2. Mecanismos de reparação do DNA

Estas DSBs, em células eucariotas, são reparadas, maioritariamente, por duas vias (Figura 1): *homology-directed repair* (HDR) e *non-homologous end joining* (NHEJ)<sup>6,8</sup>.

A reparação pela via HDR, menos eficiente mas mais fiável que a via NHEJ, requer a presença de *templates* de DNA com extremidades homólogas, sendo ativa, por isso, no final da fase G2 e ao longo da fase S do ciclo celular, quando cromátídeos irmãos estão disponíveis para servir de molde<sup>9</sup>. Em contexto de edição génica, recorre-se a *templates* artificiais, geralmente, a oligonucleótidos de cadeia simples (ssOGNs), quando a sequência a inserir é curta, como na correção de mutações pontuais, ou plasmídeos, para a inserção de sequências longas, como transgenes completos, que serão recombinados no local da clivagem, resultando, assim, numa reparação precisa<sup>5,9,10</sup>. Estratégias assentes neste mecanismo de reparação são empregues na correção de genes e/ou introdução de sequências ou mutações específicas, através do fornecimento de um *template* exógeno de DNA<sup>9</sup>.

O mecanismo NHEJ, mais eficiente que a via HDR, mas propenso a erros, e ativo ao longo de todas as fases do ciclo celular, atua através da inserção ou deleção (*indel*) aleatória de nucleótidos no local de corte<sup>6</sup>. Este mecanismo resulta, geralmente, em reparações pouco fidedignas, até porque, perante uma reparação precisa da DSB, o *locus* continuará a servir de substrato para futuros cortes, sobretudo em situações de sobre-expressão dos componentes do sistema. Este mecanismo é utilizado para o *knockout* de genes através da introdução de mutações *frameshift*, criando codões de stop prematuros na *open reading frame* (ORF) de determinado gene e/ou proteínas não funcionais<sup>11,12</sup>.

## **2. Vantagens da CRISPR/Cas9**

É um sistema caracterizado por boa especificidade, sensibilidade e eficiência, e baixa citotoxicidade, mostrando-se superior a outras ferramentas de edição génica (Tabela 1)<sup>8</sup>. No contexto de edição génica, é relativamente simples e facilmente (re)programável, uma vez que se baseia na hibridização entre RNA e DNA e faz uso da mesma proteína independentemente do alvo molecular, permitindo facilmente direcionar a nuclease para diferentes *loci*/alvos, através do desenho de um sgRNA apropriado<sup>1</sup>. Comparativamente, a ação das *zinc finger nucleases* (ZFNs) e das *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) baseia-se na interação direta entre o DNA e proteínas (domínios proteicos), obrigando à conceção de uma nova nuclease para cada um dos alvos a editar<sup>1</sup>. Consequentemente, ao contrário das ZFNs e TALENs, a CRISPR/Cas9 permite a introdução, em simultâneo, de múltiplas alterações em diferentes regiões do genoma (*multiplex genome editing*)<sup>13</sup>. Adicionalmente, o domínio

nuclease das ZFNs e TALENs é o FokI, que requer dimerização prévia para a indução de DSBs, obrigando à entrega de duas nucleases para a região-alvo e levando, assim, a maiores dificuldades do ponto de vista técnico<sup>6</sup>.

**Tabela I** – Comparação entre ZFN, TALEN e CRISPR/Cas9. Adaptado de ref. (6)

	<b>ZFN</b>	<b>TALEN</b>	<b>CRISPR/Cas9</b>
Construção	Conceção de uma proteína para cada alvo	Conceção de uma proteína para cada alvo	Desenho do spacer do sgRNA (20 nt)
Reconhecimento da sequência-alvo	Interações proteína-DNA	Interações proteína-DNA	Interações RNA-DNA
Endonuclease	FokI	FokI	Cas9 e suas variantes
Entrega	2 ZFNs para a região-alvo	2 TALENs para a região-alvo	sgRNA e Cas9
Comprimento da sequência-alvo	(9 ou 12 bp) × 2	(8-31 bp) × 2	(17-20 bp + NGG) × 1
Eficiência	Baixa	Moderada	Elevada

### 3. Limitações à aplicação da CRISPR/Cas9

Apesar do enorme potencial da CRISPR/Cas9 na vertente da engenharia genética, existem ainda alguns desafios/limitações a ultrapassar para que possa ser feita a transposição para terapia génica em humanos<sup>8</sup>.

#### 3.1. Especificidade/Efeitos *off-target*

Apesar de ser dotada de uma especificidade relativamente elevada, esta tecnologia encontra-se associada a efeitos *off-target* (OTEs)<sup>14</sup>, isto é, a alterações/*indels* em regiões genómicas (*loci*) não pretendidas, o que compromete a segurança do sistema, tendo em conta a natureza permanente das modificações genómicas.

A ligação do complexo Cas9/sgRNA a uma determinada sequência genómica caracteriza-se por envolver um excesso de energia, o que permite acomodar *mismatches* entre o sgRNA e a sequência-alvo<sup>15</sup>. A tolerabilidade à presença de *mismatches* dependerá do seu número, posição (se distais ou proximais ao PAM) e tipo de base envolvida<sup>1</sup>. Estes OTEs podem não ter qualquer consequência funcional<sup>16</sup>, mas também podem levar a toxicidade e instabilidade genómica, carcinogenicidade, disrupção de genes, alterações epigenéticas, transformação e morte celular<sup>1</sup>. Como tal, deve ser cuidadosamente avaliada a sua potencial indução após a transdução das células com o sistema<sup>1,16</sup>. Para isso, é necessário não só aumentar a especificidade, como também desenvolver métodos de caracterização genómica extremamente sensíveis e preditivos que permitam a deteção prévia deste tipo de eventos<sup>1,16</sup>.

A especificidade do sistema é determinada por diversos fatores relacionados com a especificidade intrínseca da nuclease, o PAM, o sgRNA, a sequência-alvo de DNA e a expressão do sistema ao nível das células<sup>16</sup>.

*Mismatches* na região distal ao PAM, i.e. a *non-seed region*, são melhor toleradas que *mismatches* na região proximal ao PAM, i.e. a *seed region*, ou seja, nos primeiros 8 a 12 nucleótidos proximais ao PAM<sup>17</sup>, uma vez que as últimas resultam numa diminuição acentuada ou na abolição da atividade da nuclease<sup>16</sup>. Isto sugere que poderão existir nucleótidos na região distal ao PAM que não são necessários para que ocorra a clivagem da sequência-alvo, podendo estes estabilizar a ligação a sequências semelhantes à sequência-alvo<sup>15</sup>.

Uma quantidade ou persistência excessiva dos componentes do sistema favorece a ligação a locais de menor afinidade, a introdução de *indels* indesejáveis e/ou uma diminuição da eficiência de reparação do DNA<sup>17,18,19</sup>.

A própria estrutura (secundária) e composição do sgRNA, por si só, têm efeito na especificidade do sistema, ao influenciar a concentração efetiva ao nível das células, a complementaridade com o alvo, a ligação da Cas9 e/ou a estabilidade da ligação ao DNA<sup>16</sup>.

A especificidade poderá ainda ser condicionada pela acessibilidade da cromatina e por fatores epigenéticos, como a metilação do DNA e a modificação de histonas, uma vez que estes poderão limitar o reconhecimento e a ligação ao alvo por parte do complexo RNP<sup>16</sup>.

A abundância de sequências-alvo, o comprimento dessas mesmas sequências e o grau de homologia relativamente a outras sequências genómicas são outros fatores a considerar aquando da avaliação da especificidade do sistema e desenho do sgRNA<sup>16</sup>.

### 3.2. Desfecho da edição

Mesmo atuando no alvo objetivado (*on-target*), a reparação dos cortes induzidos pela Cas9 pode originar inserções ou deleções não pretendidas, que, por sua vez, podem resultar em mutações *frameshift*, codões de stop prematuros, *splicings* aberrantes e/ou produtos de expressão de genes (proteínas) truncados e, conseqüentemente, potencial patogenicidade<sup>9</sup>, envolvendo, por exemplo, a ativação de oncogenes ou a inativação de genes supressores de tumores<sup>18</sup>. Adicionalmente, a atuação deste sistema pode induzir a interrupção do ciclo celular, como resposta à indução das DSBs, por ativação da p53<sup>20</sup>. Logo, uma edição bem sucedida será mais provável em células com p53 disfuncional (i.e. com gene da p53 alterado), favorecendo assim a seleção de células com potencial carcinogénico<sup>20</sup>. Para além disso, Kosicki *et al.*<sup>21</sup> reportaram a deleção de largos segmentos genéticos (com comprimentos de várias kb) e a potencial indução de rearranjos cromossómicos, decorrentes da atividade *on-target*.

### 3.3. Eficiência de edição

A eficiência de edição é ainda insuficiente para que se atinja o limite terapêutico em determinados contextos experimentais ou clínicos<sup>8</sup>. Sobretudo para aplicação clínica, é necessário aumentar o rácio HDR:NHEJ, uma vez que o *knockout* de genes por NHEJ permite apenas tratar um número limitado de patologias, sendo que, para muitas delas, é necessária a correção precisa de uma mutação pontual ou a inserção de uma sequência apropriada, como a cópia funcional de um gene<sup>22,23</sup>.

### 3.4. Imunogenicidade dos componentes do sistema

Sendo o sistema CRISPR/Cas9 de origem bacteriana é expectável que induza respostas imunes no hospedeiro, inatas, devido ao potencial reconhecimento de sequências conservadas de ácidos nucleicos por parte de recetores de reconhecimento de padrões (PRRs), ou adquiridas, devido à presença de epítomos passíveis de serem reconhecidos por moléculas do complexo major de histocompatibilidade (MHC)<sup>5</sup>. A imunogenicidade poderá comprometer a eficácia do sistema ou impossibilitar a sua administração repetida<sup>24,25</sup>.

### 3.5. Constrangimento colocado pelo PAM

O reconhecimento do PAM é um dos requisitos para a indução de DSBs, ou seja, para a SpCas9, a janela de edição é limitada a sequências-alvo seguidas imediatamente por um trinucleótido 5'-NGG-3' na cadeia oposta. Embora o PAM para a SpCas9 esteja presente, aproximadamente, a cada 8<sup>13,26</sup> a 16<sup>27</sup> nt, as sequências editáveis em regiões do genoma ricas em A-T são limitadas, tendo em conta a predisposição G-C inerente do PAM<sup>9</sup>.

### 3.6. Eficiência da entrega

De forma a potenciar a segurança e eficácia do sistema, há necessidade de aumentar a eficiência da entrega dos componentes a células e/ou tecidos específicos, particularmente relevante em contexto *in vivo* e após administração intravenosa. A entrega *ex vivo*, em que as células são geneticamente modificadas *in vitro* e depois (re-)introduzidas no organismo, é mais segura, uma vez que não há uma exposição direta às ferramentas de edição génica, mais simples do ponto de vista técnico e permite submeter as células editadas a um controlo de qualidade<sup>12</sup>. No entanto, a retenção da função *in vivo*, das células previamente manipuladas e expandidas *in vitro*, e a quantidade necessária de células para um transplante efetivo, limita a modalidade *ex vivo* a um conjunto muito restrito de células, como, por exemplo, as células T<sup>12</sup>.

#### 4. Aplicações da CRISPR/Cas9

As aplicações da CRISPR/Cas9 baseiam-se, sobretudo, na disrupção, correção/reparação, inserção e/ou deleção de genes<sup>8</sup>. A sua utilidade encontra-se em permanente expansão com a introdução de inovações moleculares ao nível dos seus componentes que, não só aumentam o reportório de ferramentas CRISPR/Cas9 e a eficácia do sistema, como também permitem alcançar novos ramos da engenharia genética.

Uma das primeiras aplicações a ser perspetivada e demonstrada foi a manipulação do genoma/edição de genes em células de mamíferos, nas quais, através da indução de DSBs e posterior reparação pelo mecanismo NHEJ, foram inativados genes devido à criação de mutações *frameshift* nas regiões codificantes dos mesmos<sup>16</sup> (Figura 2).

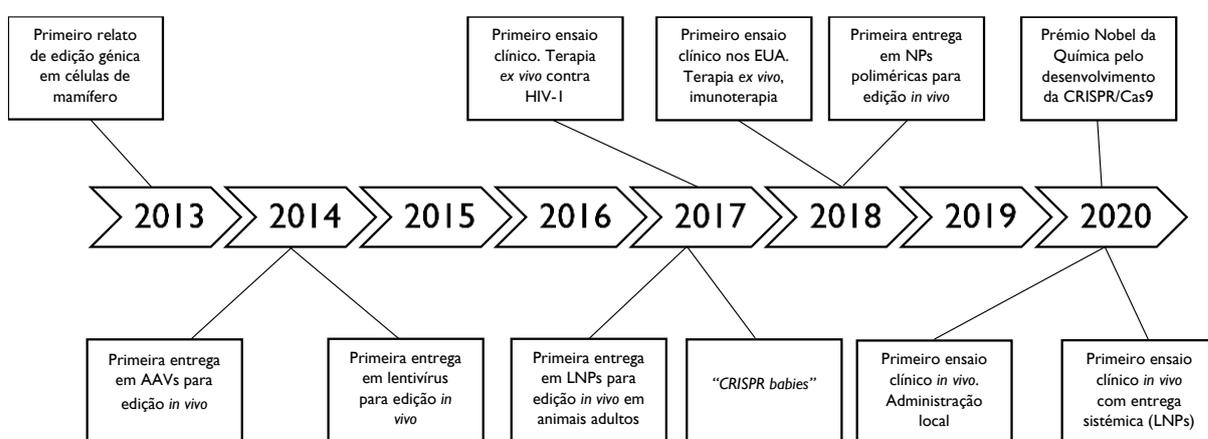


Figura 2 - Principais avanços da CRISPR/Cas9. Adaptado de ref. (10,12)

Desde então, a CRISPR/Cas9 tem sido bastante estudada no âmbito da terapia génica com vista à correção permanente de fenótipos de doenças monogénicas, mas também de doenças poligénicas, como o cancro<sup>28</sup>.

CRISPR/Cas9 apresenta também um grande potencial para o tratamento de infeções virais crónicas, como as provocadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e vírus da hepatite B (HBV), em que o genoma viral permanece integrado nas células infetadas, num estado latente, não sendo estas reconhecidas e eliminadas pelo sistema imunitário<sup>6</sup>.

Dada a capacidade do sistema em realizar o *screening* de todo o genoma de forma rápida e precisa, a realização de estudos funcionais de genes e a criação de modelos de doença torna-se bastante mais simples e económica, auxiliando na identificação e no estudo de genes envolvidos em diversas doenças, assim como na descoberta de novos alvos terapêuticos e novos fármacos<sup>6,29</sup>. É, por isso, uma ferramenta muito útil no estudo do cancro, possibilitando não só o estudo dos mecanismos de ocorrência e desenvolvimento tumoral, como também

de potenciais tratamentos e mecanismos de resistência, através da criação de modelos tumorais, do estudo de oncogenes, de genes supressores de tumores e de genes reguladores epigenéticos, do estudo dos mecanismos tumorais de evasão imunitária e da imunoterapia<sup>29</sup>.

Outra possível aplicação do sistema é a modulação do transcriptoma, recorrendo à *dead Cas9* (dCas9), uma nuclease sem capacidade de clivar o DNA, mas que retém a capacidade de se ligar ao mesmo<sup>30</sup>. Quando dirigida a promotores ou a um determinado *locus* esta interfere, respetivamente, com a iniciação ou alongação da transcrição<sup>31</sup>, podendo ainda ser fundida a domínios ativadores ou repressores da transcrição<sup>30</sup>.

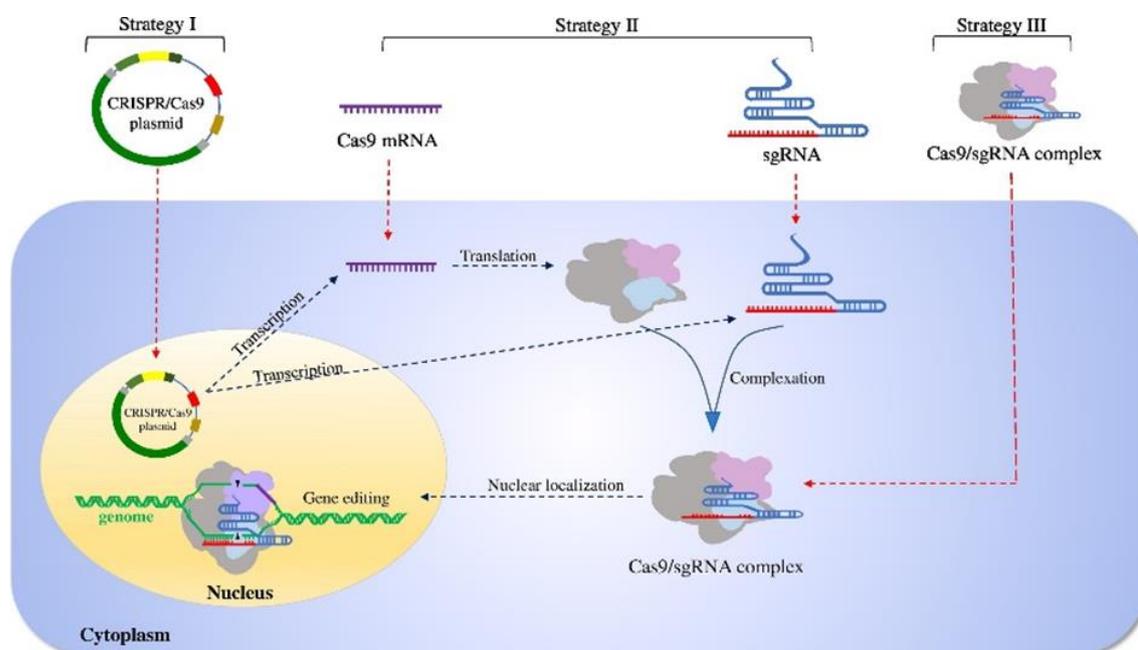
A epigenética estuda alterações na expressão de genes que não se devem a alterações na sequência primária de DNA e que envolvem mecanismos como a metilação ou desmetilação do DNA, a acetilação ou desacetilação de histonas (modificações pós-tradução) e RNAs não codificantes<sup>6,32</sup>. O sistema CRISPR/Cas9 pode ser utilizado no âmbito da modificação do epigenoma e/ou regulação epigenética através da fusão da dCas9 com efetores epigenéticos permitindo uma ativação ou repressão da transcrição, de forma reversível<sup>6,30</sup>.

A CRISPR/Cas9 permite ainda realizar a edição de bases num local preciso do genoma, sem recorrer à indução de DSBs ou *templates* para HDR. Torna-se, assim, possível a interconversão de pares de bases (bp) de forma mais eficiente, direta e irreversível, mesmo em células sem capacidade de divisão<sup>33,34</sup>. Para este propósito foram desenvolvidos os *base editors* (BE) e os *prime editors* (PE)<sup>35</sup>.

## 5. Entrega do sistema CRISPR/Cas9

### 5.1. Formatos para a entrega dos componentes

A entrega dos componentes do sistema pode ser feita sob diversos formatos (Figura 3, Tabela IS em Anexo)<sup>28</sup>.



**Figura 3** - Passos intracelulares necessários para a ação da CRISPR/Cas9, dependendo do formato em que é entregue. Adaptado de ref. (11)

A entrega sob a forma de complexo RNP é a forma mais direta para a entrega dos componentes e a que permite a edição genômica mais rápida, uma vez que não é necessário qualquer processo de transcrição e/ou tradução, com elevada eficiência e de forma transitória, contribuindo para uma menor probabilidade de OTEs, toxicidade e imunogenicidade<sup>11,28</sup>. Para além disso, não requer otimização de codões ou seleção de promotores<sup>11,36</sup>. Estes complexos formam-se fácil e eficientemente<sup>11</sup>, oferecendo proteção ao sgRNA no meio fisiológico<sup>37,38,39</sup>. No entanto, o elevado tamanho da Cas9 (~160 kDa) e a necessidade de manutenção da sua bioatividade acarretam dificuldades de formulação<sup>10,40</sup>. Adicionalmente, a obtenção da própria Cas9 purificada, bioativa e sem contaminação por endotoxinas bacterianas pode revelar-se um processo complexo, moroso e de elevado custo<sup>10,28</sup>.

Alternativamente, o mRNA da Cas9 pode ser facilmente obtido por transcrição *in vitro* (IVT), transcrição no interior de células (recorrendo a sistemas de expressão) ou síntese química<sup>37</sup>. A entrega sob a forma de mRNA garante uma rápida edição do genoma, uma vez que não requer um passo de transcrição ao nível do núcleo, e permite uma expressão transitória da Cas9, limitando a duração da edição genética e diminuindo a probabilidade de OTEs<sup>11,28</sup>, para além de acarretar um baixo risco de citotoxicidade<sup>11</sup>. No entanto, a elevada

instabilidade do mRNA, tanto em circulação como no interior das células, requer vetores que o consigam proteger de degradação e que permitam uma libertação adequada nas células-alvo<sup>28</sup>. Adicionalmente, uma expressão meramente transitória do sistema poderá conduzir a uma menor eficiência<sup>28</sup>.

A entrega sob a forma de plasmídeo é uma abordagem simples e de baixo custo<sup>28</sup>. Permite codificar no mesmo plasmídeo as cassetes da Cas9 e do sgRNA (podem ser incluídos vários sgRNAs no mesmo plasmídeo) e, até, do *template* para HDR<sup>28</sup>, obviando assim a necessidade de transdução de múltiplos componentes<sup>11</sup>, e aumentando a probabilidade de entrega e expressão simultânea dos mesmos em determinada célula<sup>36,40</sup>. Para além disso, o plasmídeo é mais estável que a Cas9 e o mRNA<sup>11,28</sup>.

No entanto, o elevado tamanho do gene da Cas9 (~4.5 kb) e o tamanho total do plasmídeo (>7 kb) dificultam a encapsulação em vetores e comprometem a eficiência da entrega *in vivo*<sup>28</sup>. O plasmídeo deve ser capaz de atravessar a membrana nuclear para que ocorra a transcrição, o que pode comprometer a eficiência de edição, devido à complexidade desta barreira, sobretudo em células sem capacidade de divisão (nas células em divisão a membrana nuclear é desfeita a cada ciclo celular)<sup>10,40</sup>, retardando, adicionalmente, o início de ação<sup>10,28</sup>. Há, ainda, que considerar a possibilidade de integração do plasmídeo no genoma das células hospedeiras ou a sua manutenção sob a forma de episoma<sup>41</sup>, potenciando a ocorrência de OTEs e o desencadear de respostas imunes exacerbadas<sup>28</sup>. Para além disso, é necessário ter em conta a potencial citotoxicidade ou *stress* celular associado à utilização de DNA<sup>22</sup>.

## 5.2. Vetores virais ou não-virais

Os vetores virais são altamente eficientes na entrega de ácidos nucleicos e são dotados de um tropismo natural para tecidos/células, assim como de mecanismos intrínsecos que permitem a ultrapassagem das principais barreiras extra e intracelulares<sup>41,42</sup>. No entanto, apresentam limitações como o risco de carcinogénese e de integração cromossómica, a limitada capacidade de encapsulação, a imunogenicidade inerente, a citotoxicidade e a complexidade de produção em larga escala<sup>28,43</sup>.

Em comparação (Tabela 2S em Anexo), os vetores não-virais apresentam um enorme potencial na entrega dos componentes CRISPR, tendo em conta: a reduzida imunogenicidade; a possibilidade de múltiplas administrações; a ausência de eventos de recombinação e/ou integração genómica<sup>28,43</sup>; o melhor controlo (temporal e quantitativo) da expressão do sistema<sup>8</sup>; a maior capacidade de empacotamento, podendo vir a acomodar, no mesmo vetor, os complexos RNPs, o mRNA da Cas9, os sgRNAs e os moldes de DNA; a maior

disponibilidade, facilidade e economia de produção em larga escala<sup>28,43</sup>. A possibilidade de encapsular, no mesmo vetor, os componentes do sistema potencia a entrega simultânea à mesma célula. A possibilidade de administrações repetidas permite obter níveis cumulativos de edição gênica e alcançar o limite terapêutico<sup>41,43,44</sup>. A expressão transitória dos componentes contribui para a diminuição de OTEs<sup>43</sup>. No entanto, estes vetores requerem, geralmente, funcionalização de forma a permitir a vetorização para células específicas (o que poderá constituir uma vantagem na medida em que a modificação controlada da sua composição e/ou superfície permitirá uma adaptação a diferentes alvos) e de forma a favorecer a libertação a partir do endossoma<sup>42</sup>. Como tal, é ainda necessário aprimorar este tipo de vetores para que se alcancem eficiências adequadas de entrega e expressão dos componentes do sistema nas células-alvo, particularmente em doenças extra-hepáticas<sup>28</sup>.

## **6. Obstáculos à entrega do sistema em vetores não-virais**

Tendo em conta o rápido desenvolvimento de vetores sintéticos e as vantagens únicas que oferecem é compreensível que o foco de investigação, atualmente, resida neste tipo de vetores. No entanto, há ainda barreiras consideráveis a ser ultrapassadas, sobretudo com vista a uma aplicação *in vivo* e/ou entrega sistémica, para que a eficiência da entrega seja a adequada.

### 6.1. Eficiência de encapsulação

Como tal, o primeiro desafio reside na encapsulação efetiva dos componentes no vetor e na necessidade de manter intactas as propriedades biológicas dos mesmos ao longo do processo. A Cas9 apresenta um tamanho superior à maioria das proteínas<sup>28</sup>. De forma similar, o gene da Cas9 e o respetivo mRNA (~4500 nt) são igualmente de grandes dimensões<sup>28</sup>. A Cas9, ao contrário da maioria das proteínas, que são carregadas negativamente, é uma proteína carregada positivamente<sup>28</sup>. Os ácidos nucleicos, como o mRNA, o sgRNA, o template de DNA ou o plasmídeo (cDNA), apresentam uma densa carga negativa<sup>40</sup>. No entanto, os complexos RNP apresentam carga negativa, possibilitando a encapsulação, com base em interações eletrostáticas, já aplicada a outros ácidos nucleicos, como plasmídeos e RNA<sup>40</sup>.

### 6.2. Estabilidade no meio fisiológico

Há que considerar a estabilidade do vetor em condições fisiológicas, tendo em conta a suscetibilidade dos componentes CRISPR/Cas9 à degradação por proteases e/ou nucleases, a possibilidade de agregação e/ou opsonização do vetor e sua eliminação pelo sistema reticuloendotelial (RES), ou de uma rápida eliminação renal deste (<5 nm<sup>45</sup>)<sup>28,46</sup>. A redução do tamanho da partícula (<100 nm)<sup>10,46,47</sup> permite a ultrapassagem de diversas barreiras *in vivo*, ao

minimizar interações com componentes presentes no sangue e a eliminação pelo RES, assim como uma potencial retenção na matriz extracelular e inadequado tráfego intracelular<sup>45,46</sup>.

### 6.3. Camuflar dos componentes

O vetor deve ser capaz de mascarar os componentes do sistema, uma vez que estes são inerentemente imunogénicos, devendo o próprio vetor apresentar baixa imunogenicidade, prevenindo assim o desencadear de respostas imunes por parte do hospedeiro com a consequente eliminação desses componentes e/ou células onde estão presentes<sup>28</sup>. Propriedades da partícula, como o tamanho, carga de superfície e impedimento estérico, têm influência na compatibilidade com o sistema imunitário<sup>28</sup>.

### 6.4. Especificidade celular

Outra limitação passa pela acumulação insuficiente do sistema ao nível das células-alvo que, não só compromete a eficácia de edição *on-target*, como pode potenciar a ocorrência de OTEs<sup>28</sup>. Os vetores não-virais, ao contrário dos vetores virais, se desprovidos de componentes que permitam a sua vetorização (ativa) para células específicas, sustentam-se em mecanismos de vetorização passiva para determinados tecidos<sup>48</sup>. Mas antes, para que o vetor atinja as células-alvo, este deve ser capaz de atravessar o endotélio e a matriz extracelular aniónica e só depois poderá ser captado pelas células<sup>42,46</sup>. Nanopartículas com diâmetros compreendidos entre 10 e 200 nm são mais propensas a acumulação em tumores, devido ao efeito de retenção e permeação aumentada (EPR), em locais de inflamação e/ou sinusóides hepáticos, uma vez que as junções endoteliais permitem um maior extravasamento<sup>45,46</sup>.

### 6.5. Libertação a partir do endossoma

Após internalização, os componentes devem ser capazes de se libertar do sistema endolisossomal, para que não sejam degradados no ambiente ácido ou por ação das hidrolases lisossomais<sup>28</sup>. Para polímeros catiónicos, foi proposto o efeito “esponja de protões”, em que a presença de grupos protonáveis, como grupos amina, no interior do endossoma induz o influxo de contra-íões cloreto, criando um gradiente osmótico que leva à entrada de água e a um aumento do volume do organelo e, ultimamente, à sua lise<sup>28,42</sup>. Para lipossomas, foi proposto que os lípidos catiónicos do vetor, ao interagirem com os lípidos aniónicos da membrana interna do endossoma, formam pares de íões, com estrutura cónica, que promovem a formação/adoção de fases não-lamelares invertidas, a fase hexagonal H<sub>II</sub>, envolvidas na fusão e rutura de membranas<sup>49</sup>. A formação desta fase é favorecida com a inclusão de *helper lipids* fusogénicos, como dioleoilfosfoetanolamina (DOPE) e colesterol na formulação das nanopartículas lipídicas (LNPs)<sup>49,50</sup>.

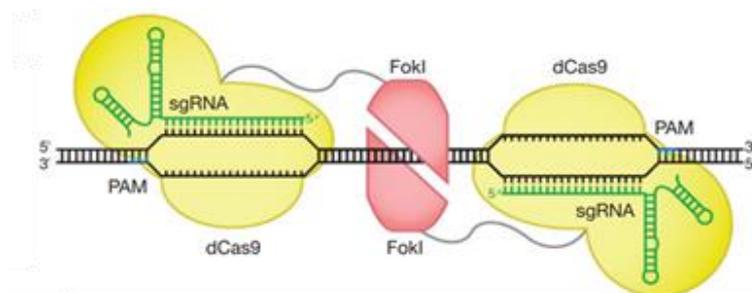
## 7. Inovações moleculares e estratégias racionais

### 7.1. dCas9, CRISPRi, CRISPRa

A dCas9 é produzida através da introdução de mutações pontuais nos dois domínios catalíticos da nuclease, RuvC e HNH, inativando-os e originando, assim, uma Cas9 cataliticamente inativa mas que retém a capacidade de se ligar ao DNA<sup>30</sup>. A utilização da dCas9 contorna os riscos associados à indução de DSBs<sup>30</sup>. Por si só, esta variante permite perturbar de forma seletiva a expressão génica, por ligação à sequência-alvo de DNA, interferindo assim com a ligação de fatores de transcrição ou RNA polimerases<sup>31</sup>. Adicionalmente, a dCas9 poderá ainda ser fundida a fatores/domínios ativadores da transcrição, como o VP64, numa estratégia designada por CRISPRa e que permite ativar seletivamente a transcrição génica, ou a fatores/domínios repressores da transcrição, como o *Krüppel-associated box* (KRAB), estratégia conhecida por CRISPRi e que permite alcançar um maior silenciamento de genes em comparação com a utilização isolada da dCas9<sup>30</sup>.

### 7.2. dCas9-FokI

A dCas9 pode ser fundida a domínios catalíticos FokI, permitindo aumentar substancialmente a especificidade do sistema, uma vez que a indução de DSBs apenas será possível após dimerização dos monómeros FokI<sup>51,52</sup>. Para isso, utilizam-se dois sgRNAs que se deverão ligar a regiões próximas no DNA, com um espaçamento de, geralmente, 15 a 25 bp<sup>51</sup>, corretamente orientados, para que os monómeros FokI possam dimerizar e gerar a DSB<sup>51,52</sup> (Figura 4).



**Figura 4** - Ilustração de DSB induzida por um par de dCas9-FokI. Adaptado de ref. (51)

O aumento substancial da especificidade, superior a 140x em células humanas relativamente à Cas9 *wild-type* (wtCas9)<sup>51</sup>, deve-se ao facto de ser pouco provável que dois complexos dCas9-FokI/sgRNA se liguem próximos um do outro em regiões fora do alvo<sup>51,52</sup>.

Teoricamente, poderia ser uma estratégia excessivamente restritiva no que toca a potenciais alvos editáveis, tendo em conta a exigência de duas sequências complementares aos *spacers* dos sgRNAs próximas uma da outra, com o PAM localizado na extremidade 3' das

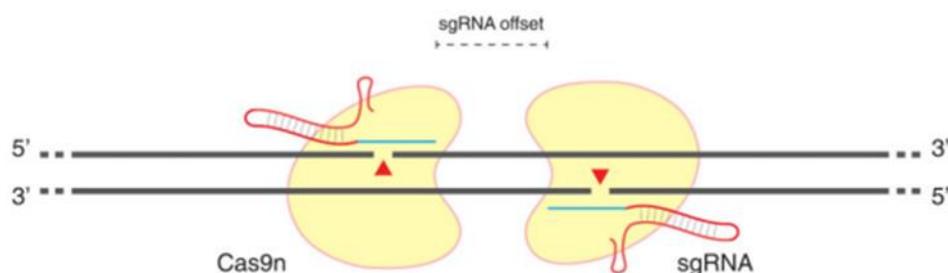
mesmas<sup>51</sup>. No entanto, estima-se que locais-alvo que cumpram os requisitos para a aplicação desta estratégia ocorram a cada 34 bp no genoma humano<sup>51</sup>.

### 7.3. Nickases

As *Cas9 nickases* (nCas9), em vez de DSBs, induzem *nicks* ou *single-stranded breaks* (SSBs), ou seja, a clivagem de apenas uma das cadeias de DNA<sup>26</sup>. As *nickases* são produzidas introduzindo mutações pontuais (substituições por alanina) em resíduos catalíticos de um dos domínios da nuclease<sup>26</sup>. A mutação D10A inativa o domínio RuvC, originando a D10A *nickase* que cliva a cadeia de DNA complementar ao sgRNA<sup>26</sup>. As mutações H840A ou N863A inativam o domínio HNH, originando a H840 ou N863A *nickase*, respetivamente, que clivam a cadeia de DNA não complementar ao sgRNA<sup>26</sup>. Estas *nickases*, ao contrário do que acontece com a *Cas9* convencional que gera extremidades rombas, são capazes de criar extensões 3' ou 5' na extremidade da cadeia clivada<sup>26</sup>, proporcionando um maior controlo sobre a inserção de determinado gene<sup>53</sup>. A mera introdução de SSBs, em detrimento de DSBs, permite uma edição mais específica e reduz OTEs, uma vez que SSBs, em células eucariotas, são reparadas com maior fiabilidade através do mecanismo de excisão de bases ou pela via HDR, dependendo do tipo de célula<sup>13,26</sup>.

### 7.4. Paired nickases

Dirigindo duas nCas9, D10A *nickases*, com recurso a um par de sgRNAs (*offset sgRNAs*), apropriadamente espaçados, orientados e direcionados para cadeias opostas, num determinado *locus*, permite a geração de DSBs com extremidades coesivas (Figura 5)<sup>26,53</sup>.



**Figura 5** - Ilustração de DSB induzida por um par de D10A *nickases*. Adaptado de ref. (53)

Isto permite alcançar uma semelhante ou maior eficiência de reparação por HDR e uma eficiência de edição *on-target* semelhante à wtCas9, mas com uma redução significativa de OTEs<sup>53</sup>. Tal acontece uma vez que é pouco provável a indução de DSBs em regiões *off-target*, visto que os dois sgRNAs teriam de se ligar, nessa região, às respetivas sequências complementares com um espaçamento adequado<sup>53</sup>. Esta estratégia, designada por *paired nickases*, permite aumentar a especificidade e reduzir a frequência de OTEs até 1500x,

relativamente à wtCas9<sup>53</sup>. Ran *et al.*<sup>53</sup> evidenciam que um espaçamento, entre o par de sgRNAs, até 100 bp, permite o *double nicking* do DNA e a geração de *indels*, embora com maior eficiência com um espaçamento de -4 a 20 bp.

De forma similar à dCas9-FokI, há, no entanto, que considerar a necessidade de expressão de pares de sgRNAs corretamente posicionados e orientados, ainda mais relevante em contexto de *multiplexing*, que poderá limitar o número de locais do genoma editáveis<sup>9</sup>.

Comparativamente, a estratégia assente na dCas9-FokI é considerada igualmente eficiente e mais específica que as *paired nickases*, sobretudo em *loci* com locais *off-target* altamente similares<sup>51</sup>. As *nickases* podem induzir a clivagem do DNA como monómeros, resultando em SSBs, que, embora com reduzida frequência, podem resultar na geração de *indels*, ao contrário da dCas9-FokI, que requer uma dimerização prévia<sup>51,52</sup>. Adicionalmente, as *paired nickases*, mesmo com um espaçamento até cerca de 100 bp, são capazes de gerar eventos de modificação genómica semelhantes aos que se verificam com a indução de DSBs, o que se traduz num aumento de potenciais locais *off-target*, embora também numa maior flexibilidade na escolha de alvos<sup>51,53</sup>.

### 7.5. Base editors

De forma a possibilitar a modificação precisa de bases, sem a indução de DSBs e sem recorrer a HDR, foram desenvolvidos os *base editors* (BE). Os *cytosine base editors* (CBEs) e os *adenine base editors* (ABEs) são capazes de induzir duas transições de bases cada<sup>6</sup>. No caso do CBE, este é capaz de induzir a transição de citosina (C) para timina (T) e, na cadeia oposta, a transição de guanina (G) para adenina (A)<sup>6</sup>. No caso do ABE, este é capaz de induzir a transição de A para G e, na cadeia complementar, a transição de T para C<sup>6</sup>. Tendo em consideração que a maioria das doenças genéticas humanas decorrem de mutações pontuais<sup>34,41</sup>, a conversão de adenina a guanina e citosina a timina, poderá permitir a correção de uma parte significativa dos polimorfismos de nucleótido único (SNPs) associados a patologias humanas<sup>33,54</sup>.

#### 7.5.1. Cytosine base editor (CBE)

O CBEI, originado pela fusão, no terminal amina da dCas9, de um domínio citosina desaminase, geralmente a subunidade I da desaminase do mRNA da apolipoproteína B (APOBEC1), converte a citosina, da cadeia não complementar ao sgRNA, a uracilo, originando o par U/G que, pelo mecanismo de *mismatch repair* (MMR), é convertido a U/A e este, depois, a T/A<sup>33,55</sup>. O CBEI demonstrou ser eficaz *in vitro*, no entanto, em células humanas, o intermediário U/G é revertido a C/G pelo mecanismo de reparação por excisão de bases (BER) por ação da uracilo N-glicosilase (UNG)<sup>54</sup>.

Como tal, procedeu-se à fusão do inibidor da uracilo N-glicosilase (UGI) ao terminal carboxilo do CBE1, dando origem ao CBE2 e permitindo um aumento da eficiência de edição em células humanas<sup>6,34</sup>. O CBE3 difere do CBE2 pela utilização da D10A *nickase* em vez da dCas9, o que permite a clivagem da cadeia contendo a G do intermediário U/G, formado após a desaminação da citosina, ou seja, a clivagem da cadeia complementar ao sgRNA. Este corte favorece o mecanismo MMR, direcionando a reparação do intermediário U/G para U/A<sup>55</sup>. O CBE3 conduziu a um aumento da eficiência de edição, mas também da frequência de *indels* que, ainda assim, ocorrem a uma frequência inferior à que se verifica após indução de DSBs<sup>6,34</sup>.

O CBE4 é formado pela fusão de uma cópia adicional do UGI à *nickase*, permitindo diminuir conversões não pretendidas, mediadas pelo mecanismo BER, de C a G/A. O CBE4 revelou uma maior eficiência de edição, assim como uma redução da frequência de *indels*<sup>56</sup>.

Tirando partido do CBE3, Kuscu *et al.*<sup>57</sup> realizaram a conversão de C para T nos codões CGA, CAG e CAA, criando os codões de *stop* TGA, TAG e TAA, respetivamente. Como resultado, verificou-se o *knockout* desses genes, devido à inserção prematura destes codões *stop*, de forma mais eficiente e segura que a conseguida pela wtCas9<sup>57</sup>.

#### 7.5.2. Adenine base editor (ABE)

Tendo em conta a inexistência de uma adenosina desaminase capaz de atuar ao nível do DNA, para a construção do ABE recorre-se, geralmente, a uma adenosina desaminase do RNA transferência (TadA) de *Escherichia coli*, obtida por evolução direta e capaz de realizar a desaminação em DNA de cadeia simples (ssDNA)<sup>33</sup>. Esta converte a adenina a inosina, originando o par I/T que, pelo mecanismo de MMR, é convertido a I/C e este, posteriormente, a G/C<sup>6,33,55</sup>. No caso do ABE, e ao contrário do CBE, não há necessidade de associar um inibidor do mecanismo BER, visto que a atividade deste na remoção de inosina é mínima<sup>33</sup>.

A formação de uracilo e timina por desaminação espontânea de citosina e 5-metilcitosina, respetivamente, resultam na transição C-G para T-A, estando esta na base de cerca de metade dos SNPs patogénicos conhecidos, podendo ser corrigidas pelo ABE<sup>33,54</sup>. Para a construção do ABE7.10 recorre-se ao desenho de heterodímeros incorporando, numa única cadeia polipeptídica, um monómero *TadA wild-type* (wtTadA), desprovido de atividade catalítica em ssDNA, e um monómero TadA (TadA\*) contendo 14 substituições de aminoácidos no domínio catalítico, relativamente à wtTadA e identificadas ao longo de 7 rondas de evolução, que são depois fundidos a uma SpCas9 *nickase* (wtTadA-TadA\*-SpCas9 D10A *nickase*)<sup>33,54</sup>. Gaudelli *et al.*<sup>33</sup>, em células HEK293T, reportaram, com o ABE7.10, uma frequência média de edição de bases de 55% e uma incidência de OTEs muito inferior à wtCas9.

### 7.5.3. Limitações dos *base editors*

No entanto, os BEs apresentam limitações como a indução de OTEs, mais frequente no caso dos CBEs<sup>54</sup>. Ao nível do DNA, estes eventos podem ocorrer de forma dependente ou independente do sgRNA<sup>41</sup>. No que toca a OTEs dependentes do sgRNA, estes verificam-se em menor frequência com o CBE e ABE quando comparando com nucleases wtCas9<sup>33,55</sup>. Potenciais soluções poderão passar pela substituição da nuclease do BE por uma variante Cas9 com elevada especificidade ou pela otimização do sistema de entrega<sup>55</sup>. No que toca a OTEs independentes do sgRNA, estes foram frequentemente detetados no caso do CBE, mesmo empregando no BE variantes Cas9 de elevada especificidade, mas não no caso do ABE, em que a desaminação de nucleótidos de forma independente do sgRNA raramente se verificou<sup>55</sup>. Estas observações sugerem que estes eventos de desaminação resultam da citosina desaminase, e não da Cas9<sup>55</sup>. Adicionalmente, Grünwald *et al.*<sup>58</sup> relataram, para o CBE e ABE, a desaminação de citosinas e adeninas, respetivamente, ao nível do RNA, por ação dos domínios desaminase (independentemente do sgRNA).

Os BEs induzem ainda *bystander edits*, isto é, a edição de nucleótidos adjacentes ao nucleótido-alvo dentro da janela de edição<sup>34</sup>. De uma forma pouco assertiva, no caso dos CBEs (CBE3 e CBE4), a janela de desaminação é de 5 nucleótidos, na extremidade distal ao PAM, mais concretamente nas posições 4-8, considerando o PAM como as posições 21-23, enquanto que para o ABE7.10 é, frequentemente, de 4 nucleótidos, mais concretamente nas posições 4-7<sup>54</sup>. Estas janelas limitam o número de locais adequados a edição de bases, pelos BEs, tendo em conta a necessidade de existir um PAM corretamente localizado<sup>59</sup>. Muitas vezes, estes *bystander edits* não ocorrerão ou não terão qualquer consequência, devido à redundância do genoma (mutação silenciosa) ou quando o objetivo passa pela interrupção de sequências genómicas específicas e/ou *knockout* de genes<sup>54</sup>.

Devido ao constrangimento colocado pelo PAM, apenas uma modesta fração dos SNPs patogénicos conhecidos podem ser alvo dos BEs sustentados na utilização da SpCas9<sup>27,54</sup>. Muitas vezes, o que se pretende é a edição de uma base específica, o que requer uma estreita janela de edição, no entanto, uma janela de edição mais estreita requer sistemas capazes de reconhecer uma maior variedade de PAMs, de forma a não limitar excessivamente a aplicabilidade do BE<sup>54</sup>. Potenciais soluções residem no desenho de BEs com diferentes especificidades para PAMs, através do emprego de variantes Cas9 obtidas por evolução direta e que reconheçam PAMs alternativos, como a xCas9<sup>27</sup>, com o objetivo de expandir o número de locais acessíveis a edição de bases, ou em BEs com uma janela de edição mais estreita (1 a 2 nt), através da inserção de mutações em resíduos da desaminase que diminuam a eficiência

catalítica da enzima (e.g. na APOBEC1, resíduo W90 é crucial para a criação de um local ativo hidrofóbico, essencial à atividade desaminase) ou alterem a sua interação com o ssDNA (e.g. na APOBEC1, resíduos E126 e E132 são pontos de interação com o esqueleto de DNA)<sup>59</sup>.

#### 7.6. Prime editing

O PEI recorre à *nickase* H840A, fundida a uma transcriptase reversa (DNA-polimerase RNA-dependente), a transcriptase reversa do vírus da leucemia murina de Moloney (M-MLV RT)<sup>6,35</sup>. Para alcançar a edição pretendida, é utilizado um *prime editing guide RNA* (pegRNA) que, não só especifica o local de clivagem, como também codifica a edição que se pretende introduzir no genoma-alvo<sup>35</sup>. O pegRNA é formado a partir de sgRNAs por adição, na extremidade 3', de um *template* para a transcriptase reversa e de um *primer binding site* (PBS), que permite a hibridização com a extremidade 3' da cadeia previamente clivada de DNA, atuando esta como *primer* para a transcrição reversa<sup>35</sup>. O *template* é desenhado de forma a permitir a disrupção do PAM no genoma-alvo, prevenindo assim a indução de novos cortes na cadeia previamente editada, antes da resolução do *heteroduplex* criado<sup>35</sup>.

Após o pegRNA hibridizar com a sequência-alvo, a *nickase* induz a clivagem da cadeia de DNA não complementar ao pegRNA. Desta clivagem, resulta a exposição de um grupo 3'-OH, criando-se um *primer*, reconhecido pelo PBS, e permitindo a adição de nucleótidos pela transcriptase reversa, isto é, a introdução da edição desejada e codificada no pegRNA, na região pretendida<sup>35</sup>. De seguida, por ação dos mecanismos de reparação do DNA, este *heteroduplex* constituído por uma cadeia de DNA editada e uma cadeia não editada é resolvido por cópia, para a cadeia não editada, da informação introduzida pela edição prévia, instalando permanentemente a modificação<sup>35</sup>.

Esta técnica apresenta inúmeras vantagens. Permite introduzir, no *locus* pretendido, uma determinada sequência nucleotídica sem recorrer a DSBs ou *templates* de DNA<sup>35</sup>. Permite realizar a introdução ou deleção de genes e ainda os 12 tipos de substituições de bases, ou seja, não só as 4 transições (C para T, T para C, G para A e A para G), como também as 8 transversões (C para A, A para C, C para G, G para C, G para T, T para G, T para A e A para G)<sup>6,35</sup>. Para além de apresentar o potencial para corrigir cerca de 89% das mutações patogénicas conhecidas<sup>35</sup>, Anzalone *et al.*<sup>35</sup> constataram que o *prime editing* revelou uma eficiência de edição semelhante ou superior e com menos *byproducts* que uma estratégia baseada no mecanismo HDR, permitiu realizar substituições precisas de bases que os BEs não permitem e apresentou uma atividade *off-target* muito inferior à Cas9 convencional.

Comparando os BEs ao *prime editing*, quando o objetivo é a alteração de um par de bases específico, os BEs são, até à data, mais eficientes que o *prime editing*<sup>35</sup>. Isto assumindo que esses nucleótidos se encontram numa posição adequada relativamente ao PAM, ou seja, dentro da janela de edição, e caso a edição de nucleótidos adjacentes, dentro dessa mesma janela, não acarrete problemas de segurança<sup>35</sup>. No entanto, os BEs encontram-se associados a *bystander edits* e, quando estes são inaceitáveis ou quando o alvo não se encontra corretamente posicionado relativamente ao PAM, o *prime editing* é superior<sup>35</sup>.

Para melhorar a eficácia do PEI, cuja eficiência de indução de transversões de bases era reduzida e dependia do comprimento do PBS, procedeu-se à conceção de uma transcriptase reversa, por introdução de 5 mutações, que permitisse aumentar a eficiência de edição, ao apresentar maior termoestabilidade, capacidade de processamento e afinidade para o substrato RNA:DNA, sendo ainda compatível com sequências PBS mais curtas<sup>35</sup>. A utilização da referida transcriptase deu origem ao PE2 que, comparativamente ao PEI, aumentou não só a eficiência de substituição de bases, como também a eficiência de inserções e deleções<sup>35</sup>.

O PE3, com o objetivo de aumentar ainda mais a eficiência de edição, utiliza, além do pegRNA, um sgRNA convencional que hibridiza com a cadeia não complementar ao pegRNA, dirigindo a ação da *nickase* H840A para a cadeia não editada, potenciando assim a inserção da edição desejada nesta segunda cadeia, utilizando como molde a cadeia inicialmente editada<sup>35</sup>. *Nicks* induzidos pelo sgRNA 40-90 bp 3' ao *nick* induzido pelo pegRNA, revelaram superior eficiência, sem formação excessiva de *indels*<sup>35</sup>. No PE3b, o sgRNA utilizado é desenhado de forma a que o *spacer* seja apenas complementar à cadeia editada e não ao alelo original, ao contrário do PE3, o que permite que a clivagem da cadeia não editada (complementar ao pegRNA) apenas ocorra posteriormente à primeira edição/*prime edit*, minimizando assim a formação de DSBs e *indels*<sup>35</sup>. Comparativamente ao PE2, o PE3 demonstrou uma maior eficiência de edição, mas também uma maior probabilidade de *indels*<sup>35</sup>. O PE3b demonstrou níveis de edição semelhantes ao PE3, mas com uma redução acentuada da formação de *indels*<sup>35</sup>.

Anzalone *et al.*<sup>35</sup> validaram a aplicabilidade do *prime editing* em células sem capacidade de divisão, como neurónios primários, em que HDR é inexistente. Gao *et al.*<sup>60</sup> compararam a eficiência do PE2 à de HDR, em ratos, relatando uma correção de ~55% das sequências por HDR e de ~21% com o PE2, no entanto, para a Cas9 foi observada uma frequência de OTEs muito mais elevada e *on-target indels* na ordem dos 40%, não se verificando a sua ocorrência com o PE2.

### 7.7. Circuitos genéticos

A construção de circuitos genéticos racionais, adaptados a determinado alvo, poderá ser uma das soluções para a problemática da especificidade do sistema. Liu *et al.*<sup>61</sup> elaboraram um circuito, *modular AND gate genetic circuit*, baseado na CRISPR/Cas9, de forma a que este apenas atua em células cancerígenas da bexiga. O circuito recorre a 2 promotores *input* que apenas permitem a expressão do gene *output* quando ativados e capazes de promover a transcrição dos respetivos genes<sup>61</sup>. Este circuito baseia-se em 4 genes e nos respetivos promotores, codificados em plasmídeos<sup>61</sup>. O primeiro promotor *input*, o promotor do gene humano uroplaquina II (*UPII*), é um promotor específico das células do urotélio da bexiga e controla a transcrição do mRNA da Cas9<sup>61</sup>. O segundo promotor *input*, o promotor do gene humano transcriptase reversa telomerase (*TERT*), é um promotor específico de células cancerígenas e controla a transcrição do sgRNA dirigido ao gene *lacI*<sup>61</sup>. O promotor constitutivo do vírus símio 40 (SV40) controla a expressão da proteína repressora codificada pelo gene *lacI*<sup>61</sup>. Esta proteína liga ao operão *lac* adjacente ao promotor do citomegalovírus (CMV) que, aqui, controla a expressão do gene *output*, o gene humano luciferase da *Renilla* (*RLUC*), impedindo assim a transcrição deste<sup>61</sup>. Portanto, apenas quando os promotores dos genes *UPII* e *TERT* se encontram ativos, ou seja, apenas em células cancerígenas da bexiga, é que se poderá formar o complexo Cas9/sgRNA que irá reconhecer e clivar o gene *lacI*, fazendo com que deixe de ser expressa a proteína repressora, o que, por sua vez, permite que ocorra a transcrição do gene *output*<sup>61</sup>.

Liu *et al.*<sup>61</sup> demonstraram a aplicabilidade a outros genes *output*, como genes apoptóticos, alcançando a expressão seletiva destes e estabelecendo a base para aplicações clínicas diferenciadas.

### 7.8. High-fidelity variants

Para contornar a potencial indução de OTEs, foram desenvolvidas novas variantes Cas9, designadas por *high-fidelity variants*, dotadas de maior especificidade, mas com semelhante eficiência de edição. Este tipo de inovação molecular está, geralmente, assente na teoria de que existe um excesso de afinidade, entre a Cas9 e a sequência-alvo de DNA, que poderá estabilizar a ligação a sequências *off-target*, isto é, a sequências com *mismatches* relativamente ao *spacer* do sgRNA e, conseqüentemente, potenciar a ocorrência de OTEs<sup>15</sup>. O objetivo passa por diminuir as interações entre a Cas9 e o DNA, aumentando o papel do *heteroduplex* RNA:DNA na determinação da edição. Tal pode ser conseguido através da inserção de mutações específicas, sustentadas em aspetos estruturais da nuclease, ou através do screening de bibliotecas de variantes resultantes da inserção de mutações aleatórias<sup>62</sup>. Estas *high-fidelity*

*variants* demonstraram alcançar uma redução de OTEs semelhante ou superior à conseguida com as *nickases*, sendo que requerem apenas um sgRNA<sup>9</sup>.

A eSpCas9(I.1) resulta de 3 substituições por alanina (K848A, K1003A e R1060A) que removem cargas positivas do *nt-groove* da Cas9, envolvido na interação com, e estabilização, da cadeia não complementar, atenuando assim a atividade helicase da Cas9 e favorecendo a re-hibridização das cadeias de DNA, o que obriga à existência de uma maior complementaridade (maior emparelhamento de bases) entre o sgRNA e a sequência-alvo<sup>63</sup>. Slaymaker *et al.*<sup>63</sup> demonstraram que a eSpCas9(I.1) apresenta uma atividade *off-target* drasticamente atenuada, mas semelhante atividade *on-target*.

A SpCas9-HFI é produzida substituindo, por alanina, 4 resíduos de aminoácidos (N497, R661, Q695, Q926), envolvidos no estabelecimento de ligações de hidrogénio com o esqueleto de açúcar-fosfato do DNA<sup>64</sup>. Kleinstiver *et al.*<sup>64</sup> relataram que, em células humanas e comparando com a wtCas9, a SpCas9-HFI é uma variante com semelhante atividade *on-target*, para a grande maioria dos sgRNAs testados, e sem atividade *off-target* detetável.

Com o objetivo de explicar a maior especificidade destas duas variantes, Chen *et al.*<sup>65</sup> demonstraram que a frequência e afinidade de ligação a locais *on-* e *off-target* da eSpCas9(I.1) e da SpCas9-HFI é semelhante à da wtCas9. Assim, foi proposto que o aumento da especificidade se deve a um aumento da energia necessária para a ativação conformacional do domínio HNH, uma vez que este permanece num estado conformacional cataliticamente inativo quando ligado a um substrato na presença de *mismatches*<sup>65</sup>.

Com base nesta observação, Chen *et al.*<sup>65</sup> desenvolveram a HypaCas9, que demonstrou maior especificidade que a SpCas9-HFI e a eSpCas9(I.1). A HypaCas9 inclui alterações em resíduos de aminoácidos no domínio REC3, domínio envolvido no reconhecimento do *heteroduplex* RNA:DNA e na transição da nuclease para o estado ativo, dessensibilizando-o e restringindo a ativação conformacional do domínio HNH, obrigando, assim, a uma estrita complementaridade entre o *heteroduplex* RNA:DNA<sup>65</sup>. Isto verifica-se porque a ligação do domínio REC3 ao *heteroduplex* RNA:DNA é necessário à re-orientação do domínio REC2 que, por sua vez, é necessário à ativação conformacional do domínio HNH<sup>65</sup>. A substituição por alanina de resíduos do domínio REC3, previne, na presença de *mismatches*, a transição do domínio REC2 e, conseqüentemente, o correto posicionamento do domínio HNH<sup>65</sup>.

### 7.9. Variantes SpCas9 com PAMs alternativos

Para expandir a janela de edição, têm sido introduzidas variantes SpCas9 com o objetivo de reduzir o constrangimento provocado pela necessidade de localização do PAM

(5'-NGG-3') imediatamente adjacente à sequência-alvo na cadeia oposta<sup>12</sup>. Hu et al.<sup>27</sup> relataram a introdução da xCas9, uma variante SpCas9 obtida por evolução direta e com semelhante eficiência de edição à wtCas9 em *locus* com PAM NGG, mas que reconhece PAMs como NG, GAA e GAT e apresenta uma especificidade superior à SpCas9, promovendo uma redução acentuada da atividade *off-target* em *locus* com PAMs NGG ou não-NGG.

#### 7.10. Eliminação de determinantes antigénicos

Na população humana, é frequente a pré-existência de imunidade adquirida, humoral e celular, à SpCas9, tendo em conta que *S. pyogenes* é um comensal humano/patogénio ubíquo<sup>24,25</sup>, o que poderá constituir um dos principais fatores limitantes para a eficácia e/ou segurança do sistema *in vivo*<sup>24</sup>. Para além disso, é desenvolvida uma resposta imune, humoral (mediada por anticorpos) e celular (mediada por células T), após exposição ao sistema CRISPR/Cas9, mesmo o foco dos vetores sendo a proteção e libertação da Cas9 apenas no meio intracelular<sup>24,66</sup> e uma vez que o processamento da Cas9 no meio intracelular e a apresentação dos respetivos antigénios a recetores de células T (TCRs) por moléculas MHC, pode culminar no desenvolvimento de células T reativas à Cas9<sup>25</sup>. O desenvolvimento de uma resposta imune celular (de memória) pressupõe a capacidade desse organismo, perante nova exposição à Cas9, em destruir rapidamente células transfetadas com o sistema *in vivo* e expressando a Cas9 no meio intracelular, anulando ou diminuindo o efeito terapêutico<sup>24,25</sup>.

Ferdosi et al.<sup>67</sup> demonstraram a possibilidade de eliminar epítomos imunodominantes da SpCas9, preservando a função e especificidade da nuclease, mitigando assim a resposta imune inata e adquirida. Os autores identificaram, na SpCas9, 2 epítomos imunodominantes, SpCas9\_240-248 e SpCas9\_615-623, designados por peptídeos  $\alpha$  e  $\beta$ , respetivamente, para o HLA-A\*02:01, um dos alelos MHC classe I mais prevalentes em caucasianos<sup>67</sup>. Estes 2 epítomos dominantes localizam-se ambos no lóbulo REC<sup>67</sup>. Através da mutação (substituição de um aminoácido) de resíduos âncora, nos epítomos imunodominantes identificados, envolvidos no reconhecimento desses peptídeos pelas moléculas MHC e posterior reconhecimento pelo TCR, foi demonstrada uma redução significativa da imunogenicidade da Cas9 *in vitro*, mais especificamente, uma diminuição da reatividade das células T em 25 a 30x<sup>67</sup>.

#### 7.11. Desenho e modificação do sgRNA

O sgRNA desempenha um papel fundamental na determinação do local da clivagem induzida pela Cas9, como tal, o desenho adequado ou a modificação desta molécula de RNA poderá ser uma das chaves para a melhoria da eficácia do sistema CRISPR/Cas9. Um sgRNA modificado, comparado a um não modificado, apresenta como potenciais vantagens uma maior

estabilidade, especificidade, eficiência de edição, segurança e versatilidade, com a contrapartida de um maior custo e/ou complexidade de concepção<sup>37</sup>.

#### 7.1.1.1. sgRNAs truncados (tru-sgRNAs)

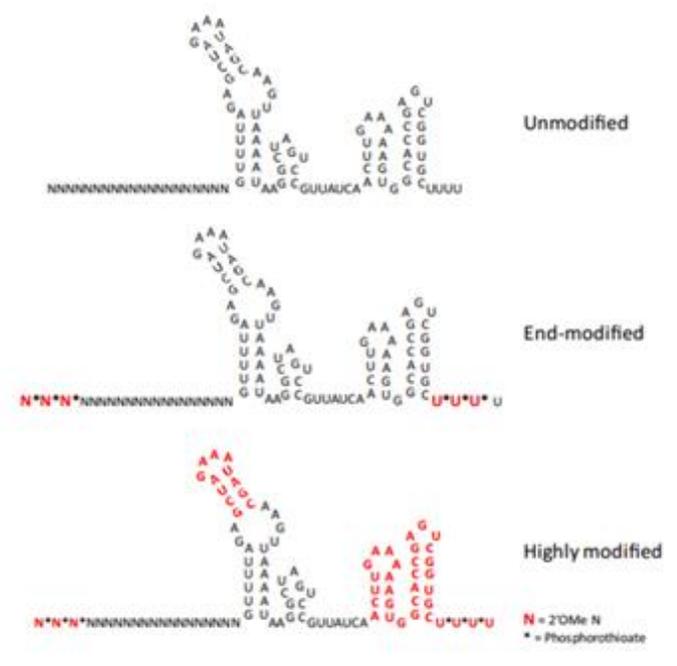
Explorando o racional de que nucleótidos na extremidade 5' do *spacer* não são necessários à atividade do sistema, mas estabilizam a interface RNA:DNA, aumentando a tolerância à presença de *mismatches* ao longo da região complementar, Fu *et al.*<sup>15</sup> reportaram que um encurtamento do *spacer*, por remoção de nucleótidos da extremidade 5', para 17 ou 18 nt (tru-sgRNAs) resultou em eficiências de edição semelhantes às que se obtêm com o sgRNA convencional mas com uma redução até 5000x ou mais de OTEs. Um encurtamento para 15 nt resultou na perda total de atividade e um encurtamento para 16 nt levou a uma redução acentuada da mesma<sup>15</sup>. Ficou ainda demonstrada a possibilidade de empregar os tru-sgRNAs em estratégias de *paired nickases*, dCas9 ou reparação por HDR<sup>15</sup>.

Em sequências com 1 ou 2 *mismatches*, os tru-sgRNAs não permitem, na generalidade dos casos, a indução de mutações em níveis detetáveis<sup>15</sup>, enquanto que com a utilização do sgRNA convencional, a Cas9 é capaz de ligar ao alvo com uma tolerância de até 10 *mismatches* e induzir clivagem na presença de 3 a 5 *mismatches* ao longo da região complementar distal ao PAM<sup>23</sup>, ou 1 a 2 *mismatches* na *seed region*<sup>5</sup>.

#### 7.1.1.2. sgRNAs quimicamente modificados

Hendel *et al.*<sup>38</sup> demonstraram que sgRNAs com modificações químicas em posições terminais 3' e 5', mais concretamente nos três nucleótidos terminais de ambas as extremidades 3' e 5', entre as quais 2'-O-metil (M), 2'-O-metil 3' fosforotioato (MS) e 2'-O-metil 3' tiofosfonoacetato (MSP) (Figura 15 em Anexo), apresentam maior estabilidade, semelhante especificidade (ligeiro efeito na atividade *off-target*) e maior eficiência de edição (frequência de *indels*) *on-target*, comparando com sgRNAs não modificados, quando co-administrados com a Cas9 ou o respetivo mRNA. sgRNAs com as modificações MS e MSP melhoraram substancialmente a eficácia de edição em células primárias<sup>38</sup>, que não toleram a transdução com plasmídeos<sup>37</sup>.

A modificação de apenas nucleótidos terminais de ambas as extremidades 3' e 5' protegeriam o sgRNA de exonucleases<sup>38</sup>, mas não de endonucleases<sup>37</sup>. Com base na estrutura do complexo RNP, Finn *et al.*<sup>44</sup> identificaram um padrão promissor de modificações 2'-O-metil e fosforotioato em ambas as extremidades do sgRNA, assim como em resíduos internos localizados nas regiões do crRNA e tracrRNA (Figura 6).



**Figura 6** - sgRNA não modificado, modificado apenas nas extremidades ou altamente modificado (interior e extremidades). Adaptado de ref. (44)

A entrega simultânea desses sgRNAs modificados, com o mRNA da Cas9, em LNPs, traduziu-se num aumento da eficiência de edição, *in vivo*, comparando à utilização de sgRNAs não modificados ou sgRNAs modificados apenas nas extremidades<sup>44</sup>.

Também com base na estrutura cristalina do complexo RNP, Yin *et al.*<sup>39</sup> identificaram nucleótidos do sgRNA envolvidos no estabelecimento de ligações de hidrogênio com a Cas9 através de grupos 2'-OH, não tolerando, por isso, modificações nos mesmos. A modificação de parte ou de todos esses nt cujos grupos 2'-OH e grupos fosfato interagem com a Cas9 reduz ou elimina a capacidade de edição do genoma<sup>39</sup>. Os autores introduziram, então, um padrão de modificações de fosforotioato, 2'-F e 2'-O-metil (Figura 2S em Anexo) nos restantes nucleótidos (70 dos 101 nt modificados)<sup>39</sup>. Estes sgRNAs, quando comparados a sgRNAs não modificados ou modificados apenas nas extremidades, maximizaram a eficiência de edição, *in vitro* e *in vivo*, quando co-formulados em LNPs com o mRNA da Cas9<sup>39</sup>.

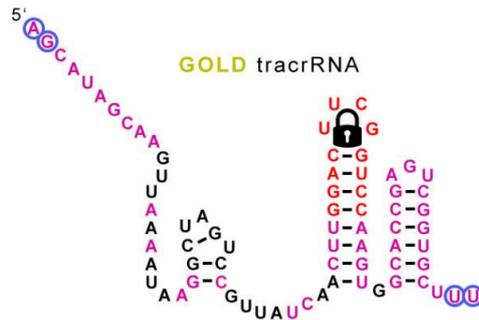
### 7.1.1.3. Inserção de estruturas secundárias

Kocak *et al.*<sup>68</sup> procederam à construção de uma estrutura secundária de RNA por inserção de um *hairpin* na extremidade 5' (distal ao PAM) do *spacer* do sgRNA (hp-sgRNA), resultando num aumento da especificidade quando combinado a diferentes efetores CRISPR. Este *hairpin* atua como uma barreira estérica e energética à formação do *R-loop*<sup>68</sup>. Assim, a formação do *R-loop* é possível em locais *on-target*, mas em locais *off-target*, devido à presença de *mismatches* e menor energia/interações entre a interface RNA:DNA, esta estrutura não é capaz de se formar<sup>68</sup>. Como a formação do *R-loop* rege a alteração conformacional que induz a ativação da Cas9, o hp-sgRNA bloqueia a atividade da nuclease em locais *off-target*, resultando num aumento da especificidade<sup>68</sup>. Este hp-sgRNA poderá vir a ser aplicado a diferentes efetores Cas, uma vez que a atividade destes é inibida em função da estabilidade da estrutura secundária inserida (*hairpin*)<sup>68</sup>. No entanto, estes *hairpins* poderão vir a ser digeridos no meio intracelular<sup>68</sup>, salientando a importância da introdução de modificações químicas no sgRNA<sup>37</sup>.

Comparando com sgRNAs convencionais e tru-sgRNAs, os hp-sgRNAs demonstraram atividade *on-target* semelhante aos sgRNAs convencionais, assim como uma redução de OTEs e um aumento da especificidade semelhante aos tru-sgRNAs, nos locais testados<sup>68</sup>.

Riesenberg *et al.*<sup>69</sup> idealizaram o *Genome-editing Optimized Locked Design (GOLD)*-gRNA com base no racional de que o *misfolding* do sgRNA (isto é, a aquisição de estruturas secundárias inadequadas) pode ser responsável pela incapacidade do sistema em clivar certas sequências de DNA (sequências refratárias) e por uma redução da eficiência de edição. O GOLD-gRNA inclui *hairpins* altamente estáveis nas regiões constantes da molécula, para além de modificações químicas que aumentam ainda mais a estabilidade deste sgRNA<sup>69</sup>.

Cada sgRNA apresenta uma região constante, pertencente ao tracrRNA, com diferentes motivos conservados, incluindo o *nexus* e 2 *hairpins*. Riesenberg *et al.*<sup>69</sup> desenharam, então, tracrRNAs, designados por *locked hairpin tracrRNAs*, em que o primeiro *hairpin* 3' ao *nexus* é alongado, oferecendo um local de nucleação para o enrolamento do RNA e prevenindo o seu *misfolding*. Com a adição, ao desenho anterior, de modificações químicas, nomeadamente ligações fosforotioato nos nucleótidos terminais das extremidades 5' e 3' e de grupos 2'-O-metil no interior da molécula, e evitando a modificação de grupos 2'-OH de nt do *loop* do *nexus*, obtém-se o que os autores designaram por GOLD-tracrRNA (Figura 7)<sup>69</sup>.



**Figura 7** - Estrutura e modificações químicas (distinguidas a cor) do GOLD-tracrRNA. Adaptado de ref. (69)

O GOLD-tracrRNA promoveu, nas sequências testadas, um aumento da eficiência de edição *on-target*, embora tenha induzido um aumento da edição *off-target*<sup>69</sup>. No entanto, a combinação do GOLD-tracrRNA com a HiFiCas9, uma *high-fidelity variant*, resultou num aumento da edição *on-target* sem qualquer efeito na edição *off-target*<sup>69</sup>. Este desenho poderá ainda vir a ser utilizado em estratégias como CRISPRi e CRISPRa, BEs ou *prime editing*<sup>69</sup>.

### 7.12. Homology-independent targeted insertion (HITI)

Uma das grandes limitações da CRISPR/Cas9 decorre da baixa eficiência da via HDR, estando mesmo esta ausente em células sem capacidade de divisão celular, que constituem a maioria das células do organismo humano (*non-dividing cells/post-mitotic cells*)<sup>41,70,71</sup>. Suzuki *et al.*<sup>70</sup> idealizaram uma estratégia, baseada na CRISPR/Cas9 e designada por *homology-independent targeted insertion* (HITI), que permite realizar a inserção de genes, *in vitro* e *in vivo*, através da via NHEJ, com maior eficiência que a via HDR e em células sem capacidade de divisão.

Enquanto que a via HDR permite substituir uma determinada sequência genómica, a HITI, sustentada em NHEJ, consiste em adicionar uma sequência exógena de DNA em determinado local, possibilitando apenas a correção de mutações *loss-of-function*<sup>71</sup>. Como a integração da sequência exógena não se sustenta na existência de homologia, a direção em que essa integração ocorre poderá não ser homogénea, aumentando ainda a probabilidade de inserção em locais *off-target* relativamente a uma estratégia assente em HDR<sup>70,71</sup>. Potenciais problemas da HITI poderão residir na ausência de controlo sobre o número de cópias integradas, assim como na indução de *indels* que levem à disrupção do local-alvo<sup>9</sup>.

Na HITI, os plasmídeos dadores são desenhados de forma a incluir locais de restrição, reconhecidos pelo complexo Cas9/sgRNA, a flanquear as sequências que se pretendem inserir (sequências dadoras) no genoma da célula hospedeira<sup>71</sup>. Utilizando diferentes sgRNAs, a Cas9 irá então clivar o genoma-alvo, mas também estes plasmídeos, levando à sua linearização e

dando origem a sequências dadoras<sup>71</sup>. Como estas não apresentam extremidades homólogas relativamente às extremidades geradas pelas DSBs no DNA-alvo, a sua reparação não pode ocorrer por HDR, potenciando assim a integração da sequência dadora por NHEJ no local de corte<sup>9,71</sup>. Para além disso, os sgRNAs utilizados foram desenhados de forma a que, quando a sequência dadora seja inserida na orientação correta (*forward direction*), ocorra a disrupção da sequência-alvo da Cas9, prevenindo cortes subsequentes e, assim, especificando e controlando a direção de inserção da sequência exógena<sup>71</sup>. Se a DSB gerada no genoma for unida por NHEJ sem a presença de erros ou se o enxerto for integrado na direção oposta (*reverse direction*), sequências-alvo de Cas9/sgRNA permanecerão intactas, sendo alvo de novos cortes<sup>70,71</sup>.

*In vitro* e comparando a HITI com o *knock-in* à base de HDR, em células HEK293 (células com capacidade de divisão, i.e. *dividing cells*), esta demonstrou uma eficiência 10 vezes superior e uma integração unidirecional, com apenas ~2% (1 em 48) de inserções na direção oposta<sup>70</sup>. *In vitro*, em células sem capacidade de divisão (fase G0/G1 do ciclo celular), neste caso, neurónios primários de rato, esta estratégia originou também uma elevada eficiência de integração<sup>70</sup>. *In vitro*, foi prevalente a ausência de inserções e/ou deleções no genoma das células-alvo<sup>70</sup>. *In vivo*, incluindo em células sem capacidade de divisão, os autores demonstraram a utilidade da HITI no *knock-in* de transgenes<sup>70</sup>. *In vivo*, as eficiências alcançadas foram muito inferiores, podendo, no entanto, permitir alcançar benefícios terapêuticos em patologias que não apresentem um limite terapêutico elevado<sup>71</sup>. No entanto, há necessidade de aumentar a eficiência de integração e os métodos de entrega e de garantir a segurança *in vivo*, considerando a potencial inserção de DNA exógeno em locais *off-target*<sup>70,71</sup>.

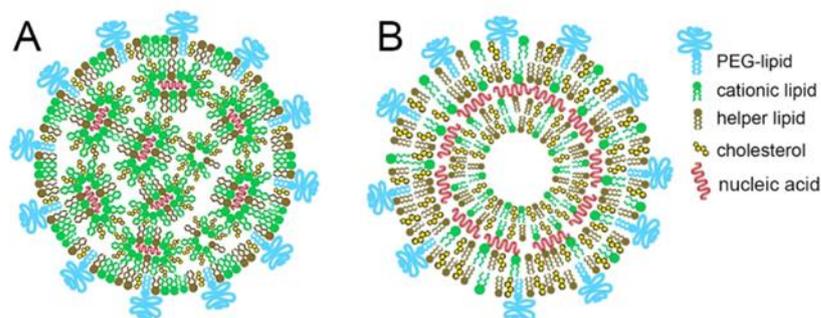
## 8. Nanopartículas Lipídicas (LNPs)

As LNPs representam um dos vetores mais desenvolvidos e utilizados para a entrega de ácidos nucleicos. Com a introdução das vacinas anti-COVID-19 e decorrentes provas de eficácia de transdução celular, de segurança e de capacidade de vetorização de mRNA das LNPs é apenas exetável que o futuro da CRISPR/Cas9 passe muito por este tipo de vetores.

Os lipossomas convencionais ou de 1<sup>o</sup> geração, a versão primordial das LNPs, formados unicamente por uma bicamada lipídica englobando um núcleo aquoso/hidrofílico, apresentavam diversos problemas como a dificuldade de retenção do conteúdo, a rápida *clearance* e a limitada capacidade de entrega intracelular<sup>72,73</sup>. As gerações seguintes de lipossomas e outros nanotransportadores lipídicos, como nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs), os transportadores lipídicos nanoestruturados (NLCs) e os complexos catiónicos lípido-ácido nucleico, visam a ultrapassagem dessas e outras limitações<sup>47</sup>.

### 8.1. Componentes das LNPs

A composição das LNPs para a entrega de ácidos nucleicos inclui um lípido catiónico ionizável, um lípido peguilado, colesterol e fosfolípidos (zwitteriónicos) como *helper lipids* (Figura 8), frequentemente fosfatidilcolina e seus derivados<sup>73</sup>.



**Figura 8** - Estruturas propostas para LNPs encapsulando ácidos nucleicos: ácidos nucleicos organizados em micelas invertidas no interior da nanopartícula (A); ácidos nucleicos intercalados entre bicamadas lipídicas (B). Adaptado de ref. (47)

O colesterol (*helper lipid*) fornece suporte estrutural, importante para a estabilidade da partícula, condicionando a sua fluidez e permeabilidade, e diminuindo o extravasamento precoce do conteúdo do vetor, culminando em eficiências de transdução superiores<sup>48,72</sup>.

O poli(etilenoglicol) (PEG) é um polímero hidrofílico, relativamente inerte e biocompatível, utilizado na formulação de LNPs com o objetivo de prevenir a agregação durante a formação das partículas, de promover a estabilidade das mesmas durante o armazenamento, de minimizar as interações entre a partícula e superfícies biológicas e de modular o tamanho das LNPs<sup>74,75</sup>. A peguilação neutraliza e confere hidrofiliabilidade à superfície das partículas, estabilizando-as, do ponto de vista estérico, reduzindo a opsonização e a agregação e, assim, a sua *clearance*, resultando numa melhoria do perfil farmacocinético e do perfil de segurança *in vivo* da partícula<sup>42,46,47</sup>.

Como contrapartida, o impedimento estérico, a neutralização da carga e o aumento da hidrofiliabilidade da superfície da partícula, promovidos pelo PEG, poderão impedir uma eficiente interação com superfícies biológicas, como as membranas das células e do endossoma, resultando, ultimamente, numa menor eficiência de transdução<sup>42</sup>. A introdução de PEGs com grupos funcionais ionizáveis (catiônicos) a pH ácido, ou de um *linker*, entre o PEG e o lípido, sensível a hidrólise ácida ou enzimática, ou ainda a utilização de conjugados PEG que, em circulação, sejam clivados da superfície da nanopartícula (*diffusible PEG conjugates*)<sup>42,73</sup>, permitem a exposição de cargas catiónicas e outros compostos com propriedades fusogénicas da partícula, promovendo a internalização celular e/ou libertação a partir do endossoma<sup>42</sup>.

Para a eficiente encapsulação de ácidos nucleicos em vesículas lipídicas, era frequente o emprego de lípidos catiónicos que, mediante interações eletrostáticas, permitissem a condensação dos polinucleótidos no interior do vetor<sup>42</sup>. No entanto, a elevada carga de superfície destes sistemas resultava em respostas imunes e em interações não específicas com superfícies biológicas, com conseqüente formação de agregados, libertação prematura do conteúdo do sistema e/ou rápida *clearance* a partir da circulação pelo RES<sup>40,42,46</sup>. Para além disso, policatiões estão associados a citotoxicidade, induzindo danos na membrana das células e/ou apoptose<sup>40,42,47</sup>. Contrariamente, lípidos neutros são biocompatíveis e originam perfis farmacocinéticos favoráveis, embora não permitam uma adequada eficiência de encapsulação de polinucleótidos por ausência de interações eletrostáticas<sup>42</sup>.

Como tal, as estratégias atuais sustentam-se, sobretudo, em lípidos catiónicos ionizáveis, com pKa menor ou igual que 7<sup>76</sup>, idealmente 6,2-6,5<sup>48,73</sup>, que permitam uma mínima carga de superfície da partícula em circulação (i.e. a pH fisiológico) e uma eficiente encapsulação dos ácidos nucleicos a valores de pH baixos (inferiores ao pKa do lípido), onde o lípido se apresentará com carga positiva<sup>73</sup>. Para além disso, estes lípidos catiónicos ionizáveis são protonados no ambiente ácido do endossoma, promovendo a sua libertação<sup>49</sup>. De uma forma geral, os lípidos catiónicos ionizáveis mais eficazes compreendem: caudas hidrofóbicas ramificadas, de forma a potenciar a aquisição de uma estrutura cónica e a formação de fases não-lamelares; uma cabeça hidrofílica ionizável, geralmente composta por amins terciárias, neutra ou zwitteriônica a pH neutro, mas que, a pH ácido, adquire carga positiva; e *linkers*, geralmente biodegradáveis, unindo as caudas hidrofóbicas à cabeça hidrofílica<sup>47,73</sup>.

Os fosfolípidos (*helper lipids*), por exemplo, DOPE, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) e dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), influenciam diretamente a eficiência da entrega ao condicionarem a fluidez e permeabilidade da partícula<sup>73</sup>, assim como a sua morfologia e tamanho, auxiliando não só na sua estabilização, como na fusão com membranas celulares<sup>41</sup>. DOPC e DOPE contêm uma ligação dupla em cada cauda hidrofóbica carbonada, enquanto que DSPC é um composto saturado<sup>74</sup>. Lípidos com caudas insaturadas formam camadas lipídicas mais fluidas e favorecem a destabilização da membrana do endossoma<sup>49,74,77</sup>. Por exemplo, a geometria cónica do DOPE favorece a formação da fase hexagonal invertida H<sub>II</sub> e, conseqüentemente, a libertação a partir do endossoma<sup>48,49,50</sup>, dando, no entanto, origem a LNPs com menor estabilidade coloidal<sup>50</sup>. A geometria cilíndrica do DSPC favorece a formação de, ou estabiliza, bicamadas lipídicas e a sua elevada temperatura de transição de fase contribui para um aumento da rigidez e diminuição da permeabilidade da LNP<sup>48,50,73</sup>, sendo este o fosfolípido frequentemente utilizado em formulações de LNPs para oligonucleótidos<sup>50</sup>, por

exemplo, na formulação das LNPs das vacinas anti-COVID-19<sup>75</sup>. DSPC e DOPC contêm um grupo amina quaternário na cabeça hidrofílica, enquanto que DOPE possui um grupo amina primário<sup>74</sup>. Grupos amina quaternários apresentam maior efeito “esponja de prótons” que grupos amina primários, facilitando a libertação a partir do endossoma<sup>77</sup>.

## 8.2. Acumulação a nível hepático das LNPs

O fígado é um alvo particularmente interessante para estratégias de vetorização à base de nanopartículas, uma vez que estas, após administração sistémica, tendem a acumular-se naturalmente (passivamente) a nível hepático, uma vez que se trata de um órgão altamente irrigado e dotado de sinusóides com largas fenestrações<sup>73</sup>. As LNPs, após administração sistémica, acumulam-se ainda mais eficazmente no fígado, ao serem dotadas de um forte tropismo hepático, uma vez que interagem (processo de opsonização) com a apolipoproteína E (APOE), sendo, posteriormente, internalizadas nos hepatócitos por um processo de endocitose mediado pelos recetores LDL<sup>44,73,74</sup>. Yan *et al.*<sup>78</sup> descreveram que a APOE associa-se preferencialmente a superfícies neutras e que a captação, pelos hepatócitos, de lipossomas exibindo carga neutra a pH fisiológico é mediada quase exclusivamente pela APOE.

Considerando a via sistémica, LNPs direcionadas aos hepatócitos são as mais avançadas<sup>43</sup>. Um passo lógico passará por, numa primeira fase, otimizar estes vetores e aumentar a eficácia da CRISPR/Cas9 a nível hepático, visto que atualmente é a aplicação mais promissora<sup>10</sup>, e, depois, realizar a transposição para tecidos extra-hepáticos<sup>43</sup>.

## **9. Entrega hepática simultânea de Cas9 mRNA/sgRNA em LNPs**

A entrega simultânea do mRNA da Cas9 e sgRNA, através da mesma nanopartícula, representa uma possibilidade atrativa, tendo em conta as vantagens dos vetores não-virais e do mRNA, relativamente à utilização de vetores virais e da Cas9 purificada ou plasmídeos, e à previsível maior eficiência de edição devido à garantia de entrega dos componentes à mesma célula<sup>79</sup>.

Siegrwart *et al.*<sup>80</sup> criaram as *selective organ targeting* (SORT) LNPs em que, por adição de um quinto componente (molécula SORT) à composição genérica das LNPs, foi possível o seu direcionamento, após administração sistémica, para o fígado, baço ou pulmões, em função das propriedades e percentagem na formulação da molécula SORT e como resultado do afinar da carga interna das LNPs. Integrando diferentes lípidos catiónicos ionizáveis em formulações de LNPs, otimizadas para a entrega dos respetivos conteúdos a hepatócitos, não se verificou uma alteração do seu tropismo, no entanto, observou-se uma melhoria substancial na entrega para as células-alvo<sup>80</sup>. Mais especificamente, incorporando 1,2-dioleoil-3-dimetilamónio-propano

(DODAP), numa percentagem de 20% do total de lípidos, em 5A2-SC8 LNPs (otimizadas para a entrega de mRNA a hepatócitos), e encapsulando o mRNA da Cas9 e o sgRNA, foi detetada uma frequência de *indels* de 60% no *locus* da PCSK9 (hepatócitos) e o seu completo *knockdown* no fígado e soro, após administração intravenosa das SORT LNPs<sup>80</sup>.

Integrando aspetos vantajosos de lípidos catiónicos, como aminas ionizáveis e múltiplas cadeias alquílicas, Liu *et al.*<sup>81</sup> procederam à conceção de fosfolípidos, designados por iPhos, com uma pequena cabeça zwitteriónica ionizável e com mais de duas caudas hidrofóbicas. Os iPhos com melhor desempenho apresentavam, na sua constituição, uma amina terciária e um *linker* fosfato, que constituíam o zwitterião, e ainda três cadeias alquílicas hidrofóbicas, permitindo, assim, estabelecer relações estrutura-atividade (SAR)<sup>81</sup>.

No ambiente ácido do endossoma, o iPhos adquire carga positiva e uma estrutura cónica, facilitando a transição para uma fase hexagonal invertida e, conseqüentemente, a libertação do conteúdo a partir do endossoma, sendo este um passo extremamente limitante até para os vetores mais eficazes, como a MC3 LNP<sup>81</sup>. Os iPhos demonstraram uma eficácia *in vivo* bastante superior ao DSPC e ao DOPE, visto que ambos estes fosfolípidos possuem tipicamente um zwitterião irreversível e apenas duas caudas hidrofóbicas que não permitem que estes adquiram uma estrutura que potencie a libertação a partir do endossoma<sup>81</sup>.

As iPLNPs, para além dos iPhos, incluíam na sua composição um lípido, aqui considerado adjuvante (zwitteriónico, catiónico ionizável ou catiónico), colesterol e um lípido peguilado (DMG-PEG2000)<sup>81</sup>. Alterando o comprimento das caudas do iPhos e o lípido adjuvante empregue foi possível modular a eficácia e seletividade *in vivo* da entrega do mRNA a diferentes órgãos, inclusive para tecidos extra-hepáticos<sup>81</sup>. A inclusão de um lípido catiónico ionizável, como lípido adjuvante, nas iPLNPs promoveu a entrega simultânea do mRNA da Cas9 e sgRNA de forma seletiva para o fígado de ratos<sup>81</sup>.

Recorrendo a *zwitterionic amino lipids* (ZALs) para formar nanopartículas (ZNPs) capazes de vetorizar os componentes do sistema (mRNA da Cas9, vários sgRNAs e, possivelmente, *templates* de reparação para HDR), Miller *et al.*<sup>79</sup> alcançaram níveis adequados de edição génica, *in vitro* e *in vivo*. Os ZALs, constituídos por uma cabeça zwitteriónica de sulfobetaina, um *linker* com grupos amina e pelas caudas hidrofóbicas, combinam, no mesmo composto, o papel desempenhado pelos lípidos catiónicos e pelos lípidos zwitteriónicos na construção de LNPs, dispensando assim a inclusão de fosfolípidos na formulação das mesmas<sup>79</sup>.

Recorrendo a ratos geneticamente modificados com uma cassette *Lox-Stop-Lox* a montante do transgene da *tandem dimer tomato* (tdTomato), em todas as células, Miller *et al.*<sup>79</sup>

demonstraram que a entrega simultânea do mRNA da Cas9 e de sgRNA dirigido às sequências LoxP, *in vivo* e em ZNPs, permitia a deleção da cassete *stop* e a indução da expressão da tdTomato, especificamente a nível hepático. Após administração intravenosa, o sinal fluorescente da tdTomato foi detetado maioritariamente em células do fígado, mas também do pulmão e rins<sup>79</sup>. Mesmo após 2 meses da infusão das ZNPs, um forte sinal fluorescente era detetável no fígado e rins<sup>79</sup>. Não foram observadas alterações de peso nos ratos tratados<sup>79</sup>.

O recurso a lípidos biodegradáveis permite diminuir a citotoxicidade das LNPs, uma vez que estes são rapidamente metabolizados e eliminados do organismo, permitindo múltiplas administrações, sem acumulação prolongada a nível tecidual<sup>40,76</sup>. A incorporação de *linkers* degradáveis, como ligações dissulfureto ou grupos éster, permite reduzir potenciais efeitos tóxicos dos lípidos, sem comprometer, e por vezes até melhorar, a eficácia da entrega<sup>40,73,76,82</sup>.

Liu *et al.*<sup>83</sup> testaram a eficácia de LNPs à base de lípidos biorredutíveis na entrega *in vivo* do mRNA da Cas9 e sgRNA. O lípido biorredutível que demonstrou o melhor desempenho, BAMEA-O16B, foi co-formulado com colesterol, DOPE e DSPE-PEG2000 em LNPs<sup>83</sup>. O BAMEA-O16B é constituído por três caudas hidrofóbicas (O16B) unidas a uma cabeça aminada ionizável através de *linkers* biorredutíveis, neste caso, contendo ligações dissulfureto<sup>83</sup>. A presença destas ligações dissulfureto favorece a libertação do conteúdo da partícula no ambiente redutor intracelular<sup>83</sup>. Testes de biodistribuição destas nanopartículas revelaram que estas se acumulavam preferencialmente nos hepatócitos<sup>83</sup>. Liu *et al.*<sup>83</sup> reportaram, em ratos, uma diminuição de 80% dos níveis séricos da PCSK9, após administração intravenosa das nanopartículas à base do lípido BAMEA-O16B, e encapsulando o mRNA da Cas9 e um sgRNA dirigido ao gene da PCSK9, sem evidência de lesão hepática.

Finn *et al.*<sup>44</sup> demonstraram, em ratos, uma frequência de edição, a nível hepático, de ~70% e um *knockdown* subsequente da transtirretina (TTR) superior a 97%, após administração intravenosa de LNPs co-formuladas com o mRNA da SpCas9 e um sgRNA altamente modificado (2'-O-metil e fosforotioato) (Figura 6) e dirigido ao gene da TTR. Após uma única dose, foram detetados níveis clinicamente relevantes decorridas 52 semanas (>1 ano)<sup>44</sup>. A LNP, denominada LNP-INT01, compreende um lípido ionizável biodegradável (LP01) com um pKa de 6,1, colesterol, DSPC e um lípido peguilado (DMG-PEG2000), e permite a entrega simultânea dos 2 componentes do sistema CRISPR/Cas9 e uma acumulação/edição predominante nos hepatócitos, apresentando eficiência de encapsulação elevada (>95%) e um diâmetro <100 nm<sup>44</sup>. A maioria das LNPs presentes na clínica recorrem a lípidos ionizáveis não degradáveis, como a MC3 LNP, resultando em bioacumulação no fígado e, potencialmente,

problemas de segurança, ao contrário do que acontece com o LP01, que é biodegradável devido à presença de ligações éster lábeis<sup>83</sup>. Após resultados pré-clínicos satisfatórios<sup>44</sup>, o NTLA-2001 foi testado em contexto clínico, demonstrando uma redução de 87% nos níveis séricos de TTR, após uma dose única das LNPs, sem efeitos adversos graves reportados<sup>84</sup>.

Musunuru *et al.*<sup>85</sup> demonstraram o *knockdown* do gene *PCSK9*, no fígado de primatas, após uma única administração intravenosa de LNPs encapsulando o mRNA de um ABE e um sgRNA dirigido ao gene *PCSK9*. Os autores reportaram uma frequência média de edição de bases de 66%, com mínima frequência média de *indels* (0,2%), resultando numa diminuição dos níveis plasmáticos de *PCSK9* e c-LDL de 90% e 60%, respetivamente, permanecendo estes níveis estáveis durante, pelo menos, 8 meses<sup>85</sup>. Adicionalmente, os testes de função hepática permaneceram inalterados, não se verificando eventos adversos clínicos e ocorrendo apenas um aumento moderado e transitório das transaminases, resolvido 2 semanas após a infusão das LNPs e que terá sido provocado por estas e não pela edição do gene *PCSK9*<sup>85</sup>.

Recorrendo a LNPs encapsulando o mRNA de um ABE e um sgRNA dirigido ao gene da *PCSK9*, Rothgangl *et al.*<sup>66</sup> alcançaram frequências médias de edição de 61% no fígado de ratos e de 26% no fígado de primatas, resultando numa redução dos níveis séricos de *PCSK9* e LDL de 95% e 58%, em ratos, e de 32% e 14%, em primatas, respetivamente. Embora em ratos não tenham sido detetados anticorpos específicos contra a Cas9 e TdA e tenha sido possível aumentar os níveis de edição com uma segunda administração das LNPs, o mesmo não se verificou em primatas, nos quais foram detetadas IgGs específicas contra a Cas9 e TdA, suspeitando-se, ainda, do desenvolvimento de uma resposta imune celular<sup>66</sup>. No entanto, ficou demonstrado que a edição ocorreu predominantemente nos hepatócitos, sem ser detetada uma frequência significativa de OTEs e sem eventos adversos clínicos<sup>66</sup>.

## 10. Nota Final

A edição génica representa uma potencial solução para a correção permanente de um número gigantesco de enfermidades, para as quais não tem sido possível a obtenção de resultados terapêuticos relevantes. Os métodos de sequenciação genómica de nova geração têm permitido a identificação de inúmeros SNPs e alterações genómicas envolvidas em patologias humanas. Com a investigação cada vez mais focada na terapia génica, o número de publicações científicas, estudos pré-clínicos e clínicos tem vindo a aumentar substancialmente. Neste âmbito, as tecnologias CRISPR têm-se vindo a posicionar no topo da hierarquia.

Os primeiros ensaios clínicos recorrendo à CRISPR/Cas9 sustentaram-se, essencialmente, em vetores virais e em modificações *ex vivo* (Figura 2)<sup>28,43</sup>, com foco no

tratamento para a infeção por HIV, na imunoterapia para o cancro e no tratamento de doenças monogénicas severas, como a anemia de células falciformes e beta-talassémia<sup>86</sup>. Com a evolução dos vetores sintéticos é expectável que haja uma alteração do paradigma para uma administração *in vivo*, local ou sistémica, com recurso a vetores não-virais. Os primeiros ensaios clínicos recorrendo à entrega *in vivo* da CRISPR/Cas9 foram já registados (Figura 2, Tabela 3S em Anexo).

A completa transposição para a clínica da CRISPR só será verdadeiramente possível ultrapassando aqueles que são, provavelmente, os dois maiores desafios desta tecnologia, a entrega e os OTEs. O vetor ideal, sobretudo para administração sistémica, deverá apresentar: elevada eficiência de encapsulação; biocompatibilidade; biodegradabilidade; estabilidade em meio fisiológico; reduzida imunogenicidade; especificidade celular; elevada eficiência de transdução. Só assim poderão ser alcançados, nas células-alvo, níveis de edição terapeuticamente relevantes, favorecendo ainda o perfil de segurança *in vivo*. O controlo dos OTEs, principal obstáculo a uma aplicação clínica segura, apenas será possível com: um conhecimento mais aprofundado do funcionamento e mecanismo do sistema e da sua interação com o genoma; o desenvolvimento de métodos sensíveis e preditivos para a deteção prévia destes efeitos; o desenvolvimento de ferramentas bioinformáticas que auxiliem no desenho adequado e/ou melhoria dos componentes do sistema; a introdução de inovações moleculares e estratégias racionais que potenciem a especificidade do sistema.

Num futuro próximo, o estudo em humanos das tecnologias CRISPR e a aplicação de estratégias desenvolvidas no passado recente serão cada vez mais frequentes. Com um potencial verdadeiramente disruptivo, é apenas previsível que as tecnologias CRISPR se venham a tornar preponderantes na prática clínica, no campo da engenharia genética.

## Referências Bibliográficas

1. KARIMIAN, Ansar *et al.* - CRISPR/Cas9 technology as a potent molecular tool for gene therapy. **Journal of Cellular Physiology**. ISSN 0021-9541. 234:8 (2019) 12267–12277. doi: 10.1002/jcp.27972.
2. JINEK, Martin *et al.* - A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**. ISSN 0036-8075. 337:6096 (2012) 816–821. doi: 10.1126/science.1225829.
3. TERNS, Michael P.; TERNS, Rebecca M. - CRISPR-based adaptive immune systems. **Current opinion in microbiology**. ISSN 1879-0364. 14:3 (2011) 321–7. doi: 10.1016/j.mib.2011.03.005.
4. NISHIMASU, Hiroshi *et al.* - Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. **Cell**. ISSN 1097-4172. 156:5 (2014) 935–49. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001.
5. SLEDZINSKI, Pawel *et al.* - Paving the way towards precise and safe CRISPR genome editing. **Biotechnology advances**. ISSN 1873-1899. 49:July 2020 (2021) 107737. doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107737.
6. JANIK, Edyta *et al.* - Various Aspects of a Gene Editing System-CRISPR-Cas9. **International journal of molecular sciences**. ISSN 1422-0067. 21:24 (2020) 9604. doi: 10.3390/ijms21249604.
7. STERNBERG, Samuel H. *et al.* - DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. **Nature**. ISSN 1476-4687. 507:7490 (2014) 62–7. doi: 10.1038/nature13011.
8. CHENG, Xing *et al.* - CRISPR/Cas9 for cancer treatment: technology, clinical applications and challenges. **Briefings in functional genomics**. ISSN 2041-2657. 19:3 (2020) 209–214. doi: 10.1093/bfgp/elaa001.
9. SALSMAN, Jayme; DELLAIRE, Graham - Precision genome editing in the CRISPR era. **Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire**. ISSN 1208-6002. 95:2 (2017) 187–201. doi: 10.1139/bcb-2016-0137.
10. BEHR, Matthew *et al.* - In vivo delivery of CRISPR-Cas9 therapeutics: Progress and challenges. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. ISSN 22113835. 11:8 (2021) 2150–2171. doi: 10.1016/j.apsb.2021.05.020.
11. LIU, Chang *et al.* - Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for

- therapeutic applications. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**. ISSN 1873-4995. 266:816 (2017) 17–26. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.09.012.
12. UDDIN, Fathema; RUDIN, Charles M.; SEN, Triparna - CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future. **Frontiers in oncology**. ISSN 2234-943X. 10:August (2020) 1387. doi: 10.3389/fonc.2020.01387.
13. CONG, Le *et al.* - Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science**. ISSN 0036-8075. 339:6121 (2013) 819–823. doi: 10.1126/science.1231143.
14. FU, Yanfang *et al.* - High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. **Nature Biotechnology**. ISSN 1087-0156. 31:9 (2013) 822–826. doi: 10.1038/nbt.2623.
15. FU, Yanfang *et al.* - Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. **Nature biotechnology**. ISSN 1546-1696. 32:3 (2014) 279–284. doi: 10.1038/nbt.2808.
16. WU, Xuebing; KRIZ, Andrea J.; SHARP, Phillip A. - Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. **Quantitative biology (Beijing, China)**. ISSN 2095-4689. 2:2 (2014) 59–70. doi: 10.1007/s40484-014-0030-x.
17. HSU, Patrick D. *et al.* - DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. **Nature biotechnology**. ISSN 1546-1696. 31:9 (2013) 827–32. doi: 10.1038/nbt.2647.
18. GHOSH, Debarati *et al.* - CRISPR–Cas9 a boon or bane: the bumpy road ahead to cancer therapeutics. **Cancer Cell International**. ISSN 1475-2867. 19:1 (2019) 12. doi: 10.1186/s12935-019-0726-0.
19. PATTANAYAK, Vikram *et al.* - High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. **Nature biotechnology**. ISSN 1546-1696. 31:9 (2013) 839–43. doi: 10.1038/nbt.2673.
20. HAAPANIEMI, Emma *et al.* - CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. **Nature medicine**. ISSN 1546-170X. 24:7 (2018) 927–930. doi: 10.1038/s41591-018-0049-z.
21. KOSICKI, Michael; TOMBERG, Kärt; BRADLEY, Allan - Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. **Nature biotechnology**. ISSN 1546-1696. 36:8 (2018) 765–771. doi: 10.1038/nbt.4192.
22. KANG, Xiang Jin *et al.* - Addressing challenges in the clinical applications associated

- with CRISPR/Cas9 technology and ethical questions to prevent its misuse. **Protein & cell**. ISSN 1674-8018. 8:11 (2017) 791–795. doi: 10.1007/s13238-017-0477-4.
23. 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 (Berlin, Germany)**. ISSN 1432-1440. 98:5 (2020) 615–632. doi: 10.1007/s00109-020-01893-z.
24. MEHTA, Aditi; MERKEL, Olivia M. - Immunogenicity of Cas9 Protein. **Journal of pharmaceutical sciences**. ISSN 1520-6017. 109:1 (2020) 62–67. doi: 10.1016/j.xphs.2019.10.003.
25. CHARLESWORTH, Carsten T. *et al.* - Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. **Nature medicine**. ISSN 1546-170X. 25:2 (2019) 249–254. doi: 10.1038/s41591-018-0326-x.
26. TREVINO, Alexandro E.; ZHANG, Feng - Genome editing using Cas9 nickases. **Methods in enzymology**. ISSN 1557-7988. 546:C (2014) 161–74. doi: 10.1016/B978-0-12-801185-0.00008-8.
27. HU, Johnny H. *et al.* - Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. **Nature**. ISSN 1476-4687. 556:7699 (2018) 57–63. doi: 10.1038/nature26155.
28. LI, Ling; HU, Shuo; CHEN, Xiaoyuan - Non-viral delivery systems for CRISPR/Cas9-based genome editing: Challenges and opportunities. **Biomaterials**. ISSN 1878-5905. 171:2018) 207–218. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.04.031.
29. JIANG, Chunyang *et al.* - Application of CRISPR/Cas9 gene editing technique in the study of cancer treatment. **Clinical genetics**. ISSN 1399-0004. 97:1 (2020) 73–88. doi: 10.1111/cge.13589.
30. BREZGIN, Sergey *et al.* - Dead Cas Systems: Types, Principles, and Applications. **International journal of molecular sciences**. ISSN 1422-0067. 20:23 (2019) 6041. doi: 10.3390/ijms20236041.
31. LARSON, Matthew H. *et al.* - CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. **Nature protocols**. ISSN 1750-2799. 8:11 (2013) 2180–96. doi: 10.1038/nprot.2013.132.
32. ADLI, Mazhar - The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. **Nature communications**. ISSN 2041-1723. 9:1 (2018) 1911. doi: 10.1038/s41467-018-04252-2.
33. GAUDELLI, Nicole M. *et al.* - Programmable base editing of A•T to G•C in genomic

DNA without DNA cleavage. **Nature**. ISSN 1476-4687. 551:7681 (2017) 464–471. doi: 10.1038/nature24644.

34. KOMOR, Alexis C. *et al.* - Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. **Nature**. ISSN 1476-4687. 533:7603 (2016) 420–4. doi: 10.1038/nature17946.

35. ANZALONE, Andrew V. *et al.* - Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. **Nature**. ISSN 1476-4687. 576:7785 (2019) 149–157. doi: 10.1038/s41586-019-1711-4.

36. WANG, Hong-Xia *et al.* - CRISPR/Cas9-Based Genome Editing for Disease Modeling and Therapy: Challenges and Opportunities for Nonviral Delivery. **Chemical reviews**. ISSN 1520-6890. 117:15 (2017) 9874–9906. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00799.

37. ALLEN, Daniel; ROSENBERG, Michael; HENDEL, Ayal - Using Synthetically Engineered Guide RNAs to Enhance CRISPR Genome Editing Systems in Mammalian Cells. **Frontiers in Genome Editing**. ISSN 2673-3439. 2:January (2021) 1–16. doi: 10.3389/fgeed.2020.617910.

38. HENDEL, Ayal *et al.* - Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. **Nature biotechnology**. ISSN 1546-1696. 33:9 (2015) 985–989. doi: 10.1038/nbt.3290.

39. YIN, Hao *et al.* - Structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral in vivo genome editing. **Nature biotechnology**. ISSN 1546-1696. 35:12 (2017) 1179–1187. doi: 10.1038/nbt.4005.

40. KAZEMIAN, Pardis *et al.* - Lipid-Nanoparticle-Based Delivery of CRISPR/Cas9 Genome-Editing Components. **Molecular pharmaceutics**. ISSN 1543-8392. 19:6 (2022) 1669–1686. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.1c00916.

41. TAHA, Eman A.; LEE, Joseph; HOTTA, Akitsu - Delivery of CRISPR-Cas tools for in vivo genome editing therapy: Trends and challenges. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**. ISSN 1873-4995. 342:November 2021 (2022) 345–361. doi: 10.1016/j.jconrel.2022.01.013.

42. WANG, Tao; UPPONI, Jaydev R.; TORCHILIN, Vladimir P. - Design of multifunctional non-viral gene vectors to overcome physiological barriers: dilemmas and strategies. **International journal of pharmaceutics**. ISSN 1873-3476. 427:1 (2012) 3–20. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.07.013.

43. WEI, Tuo *et al.* - Delivery of Tissue-Targeted Scalpels: Opportunities and Challenges

- for In Vivo CRISPR/Cas-Based Genome Editing. **ACS nano**. ISSN 1936-086X. 14:8 (2020) 9243–9262. doi: 10.1021/acsnano.0c04707.
44. FINN, Jonathan D. *et al.* - A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing. **Cell reports**. ISSN 2211-1247. 22:9 (2018) 2227–2235. doi: 10.1016/j.celrep.2018.02.014.
45. XU, Yunxue; LIU, Renfa; DAI, Zhifei - Key considerations in designing CRISPR/Cas9-carrying nanoparticles for therapeutic genome editing. **Nanoscale**. ISSN 2040-3372. 12:41 (2020) 21001–21014. doi: 10.1039/d0nr05452f.
46. LI, Weijun; SZOKA, Francis C. - Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. **Pharmaceutical research**. ISSN 0724-8741. 24:3 (2007) 438–49. doi: 10.1007/s11095-006-9180-5.
47. TENCHOV, Rumiana *et al.* - Lipid Nanoparticles—From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. **ACS Nano**. ISSN 1936-0851. 15:11 (2021) 16982–17015. doi: 10.1021/acsnano.1c04996.
48. BÖTTGER, Roland *et al.* - Lipid-based nanoparticle technologies for liver targeting. **Advanced drug delivery reviews**. ISSN 1872-8294. 154–155:2020) 79–101. doi: 10.1016/j.addr.2020.06.017.
49. HAFEZ, I. M.; MAURER, N.; CULLIS, P. R. - On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. **Gene therapy**. ISSN 0969-7128. 8:15 (2001) 1188–96. doi: 10.1038/sj.gt.3301506.
50. CHENG, Xinwei; LEE, Robert J. - The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery. **Advanced drug delivery reviews**. ISSN 1872-8294. 99:Pt A (2016) 129–137. doi: 10.1016/j.addr.2016.01.022.
51. GUILINGER, John P.; THOMPSON, David B.; LIU, David R. - Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. **Nature biotechnology**. ISSN 1546-1696. 32:6 (2014) 577–582. doi: 10.1038/nbt.2909.
52. TSAI, Shengdar Q. *et al.* - Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. **Nature biotechnology**. ISSN 1546-1696. 32:6 (2014) 569–76. doi: 10.1038/nbt.2908.
53. RAN, F. Ann *et al.* - Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. **Cell**. ISSN 1097-4172. 154:6 (2013) 1380–9. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.021.
54. REES, Holly A.; LIU, David R. - Base editing: precision chemistry on the genome and

transcriptome of living cells. **Nature reviews. Genetics**. ISSN 1471-0064. 19:12 (2018) 770–788. doi: 10.1038/s41576-018-0059-1.

55. JEONG, You Kyeong; SONG, Beomjong; BAE, Sangsu - Current Status and Challenges of DNA Base Editing Tools. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**. ISSN 1525-0024. 28:9 (2020) 1938–1952. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.07.021.

56. KOMOR, Alexis C. *et al.* - Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. **Science advances**. ISSN 2375-2548. 3:8 (2017) eaao4774. doi: 10.1126/sciadv.aao4774.

57. KUSCU, Cem *et al.* - CRISPR-STOP: gene silencing through base-editing-induced nonsense mutations. **Nature methods**. ISSN 1548-7105. 14:7 (2017) 710–712. doi: 10.1038/nmeth.4327.

58. GRÜNEWALD, Julian *et al.* - Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors. **Nature**. ISSN 1476-4687. 569:7756 (2019) 433–437. doi: 10.1038/s41586-019-1161-z.

59. KIM, Y. Bill *et al.* - Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. **Nature biotechnology**. ISSN 1546-1696. 35:4 (2017) 371–376. doi: 10.1038/nbt.3803.

60. GAO, Pan *et al.* - Prime editing in mice reveals the essentiality of a single base in driving tissue-specific gene expression. **Genome biology**. ISSN 1474-760X. 22:1 (2021) 83. doi: 10.1186/s13059-021-02304-3.

61. LIU, Yuchen *et al.* - Synthesizing AND gate genetic circuits based on CRISPR-Cas9 for identification of bladder cancer cells. **Nature communications**. ISSN 2041-1723. 5:1 (2014) 5393. doi: 10.1038/ncomms6393.

62. LIU, Rongming *et al.* - Directed Evolution of CRISPR/Cas Systems for Precise Gene Editing. **Trends in biotechnology**. ISSN 1879-3096. 39:3 (2021) 262–273. doi: 10.1016/j.tibtech.2020.07.005.

63. SLAYMAKER, Ian M. *et al.* - Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. **Science (New York, N.Y.)**. ISSN 1095-9203. 351:6268 (2016) 84–8. doi: 10.1126/science.aad5227.

64. KLEINSTIVER, Benjamin P. *et al.* - High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. **Nature**. ISSN 1476-4687. 529:7587 (2016) 490–5.

doi: 10.1038/nature16526.

65. CHEN, Janice S. *et al.* - Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. **Nature**. ISSN 1476-4687. 550:7676 (2017) 407–410. doi: 10.1038/nature24268.

66. ROTHGANGL, Tanja *et al.* - In vivo adenine base editing of PCSK9 in macaques reduces LDL cholesterol levels. **Nature biotechnology**. ISSN 1546-1696. 39:8 (2021) 949–957. doi: 10.1038/s41587-021-00933-4.

67. FERDOSI, Shayesteh R. *et al.* - Multifunctional CRISPR-Cas9 with engineered immunosilenced human T cell epitopes. **Nature communications**. ISSN 2041-1723. 10:1 (2019) 1842. doi: 10.1038/s41467-019-09693-x.

68. KOCAK, D. Dewran *et al.* - Increasing the specificity of CRISPR systems with engineered RNA secondary structures. **Nature biotechnology**. ISSN 1546-1696. 37:6 (2019) 657–666. doi: 10.1038/s41587-019-0095-1.

69. RIESENBERG, Stephan *et al.* - Improved gRNA secondary structures allow editing of target sites resistant to CRISPR-Cas9 cleavage. **Nature communications**. ISSN 2041-1723. 13:1 (2022) 489. doi: 10.1038/s41467-022-28137-7.

70. SUZUKI, Keiichiro *et al.* - In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. **Nature**. ISSN 1476-4687. 540:7631 (2016) 144–149. doi: 10.1038/nature20565.

71. SUZUKI, Keiichiro; IZPISUA BELMONTE, Juan Carlos - In vivo genome editing via the HITI method as a tool for gene therapy. **Journal of human genetics**. ISSN 1435-232X. 63:2 (2018) 157–164. doi: 10.1038/s10038-017-0352-4.

72. ALLEN, Theresa M.; CULLIS, Pieter R. - Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. **Advanced drug delivery reviews**. ISSN 1872-8294. 65:1 (2013) 36–48. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.037.

73. WITZIGMANN, Dominik *et al.* - Lipid nanoparticle technology for therapeutic gene regulation in the liver. **Advanced drug delivery reviews**. ISSN 1872-8294. 159:January (2020) 344–363. doi: 10.1016/j.addr.2020.06.026.

74. EYGERIS, Yulia *et al.* - Chemistry of Lipid Nanoparticles for RNA Delivery. **Accounts of chemical research**. ISSN 1520-4898. 55:1 (2022) 2–12. doi: 10.1021/acs.accounts.1c00544.

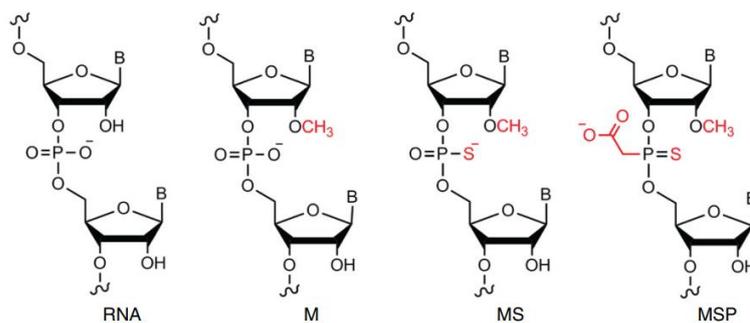
75. KIM, Jeonghwan *et al.* - Self-assembled mRNA vaccines. **Advanced drug delivery reviews**. ISSN 1872-8294. 170:January (2021) 83–112. doi: 10.1016/j.addr.2020.12.014.

76. SABNIS, Staci *et al.* - A Novel Amino Lipid Series for mRNA Delivery: Improved Endosomal Escape and Sustained Pharmacology and Safety in Non-human Primates. **Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy**. ISSN 1525-0024. 26:6 (2018) 1509–1519. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.03.010.
77. QIU, Min *et al.* - Lipid nanoparticle-mediated codelivery of Cas9 mRNA and single-guide RNA achieves liver-specific in vivo genome editing of Angptl3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. ISSN 1091-6490. 118:10 (2021). doi: 10.1073/pnas.2020401118.
78. YAN, Xuedong *et al.* - The role of apolipoprotein E in the elimination of liposomes from blood by hepatocytes in the mouse. **Biochemical and biophysical research communications**. ISSN 0006-291X. 328:1 (2005) 57–62. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.12.137.
79. MILLER, Jason B. *et al.* - Non-Viral CRISPR/Cas Gene Editing In Vitro and In Vivo Enabled by Synthetic Nanoparticle Co-Delivery of Cas9 mRNA and sgRNA. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**. ISSN 1521-3773. 56:4 (2017) 1059–1063. doi: 10.1002/anie.201610209.
80. CHENG, Qiang *et al.* - Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing. **Nature nanotechnology**. ISSN 1748-3395. 15:4 (2020) 313–320. doi: 10.1038/s41565-020-0669-6.
81. LIU, Shuai *et al.* - Membrane-destabilizing ionizable phospholipids for organ-selective mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing. **Nature materials**. ISSN 1476-1122. 20:5 (2021) 701–710. doi: 10.1038/s41563-020-00886-0.
82. QIU, Min *et al.* - Developing Biodegradable Lipid Nanoparticles for Intracellular mRNA Delivery and Genome Editing. **Accounts of chemical research**. ISSN 1520-4898. 54:21 (2021) 4001–4011. doi: 10.1021/acs.accounts.1c00500.
83. LIU, Ji *et al.* - Fast and Efficient CRISPR/Cas9 Genome Editing In Vivo Enabled by Bio-reducible Lipid and Messenger RNA Nanoparticles. **Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)**. ISSN 1521-4095. 31:33 (2019) e1902575. doi: 10.1002/adma.201902575.
84. GILLMORE, Julian D. *et al.* - CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. **The New England journal of medicine**. ISSN 1533-4406. 385:6 (2021) 493–502. doi: 10.1056/NEJMoa2107454.
85. MUSUNURU, Kiran *et al.* - In vivo CRISPR base editing of PCSK9 durably lowers cholesterol in primates. **Nature**. ISSN 1476-4687. 593:7859 (2021) 429–434. doi:

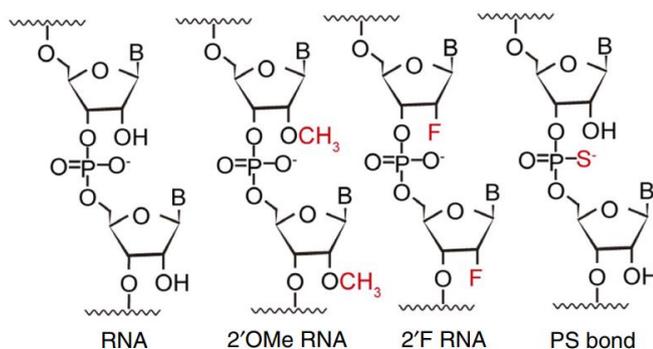
10.1038/s41586-021-03534-y.

86. LIM, Jung Min; KIM, Hyongbum Henry - Basic Principles and Clinical Applications of CRISPR-Based Genome Editing. **Yonsei medical journal**. ISSN 1976-2437. 63:2 (2022) 105–113. doi: 10.3349/ymj.2022.63.2.105.

## Anexos



**Figura 1S** - Ilustração das modificações químicas incorporadas no sgRNA. Adaptado de ref. (38)



**Figura 2S** - Ilustração das modificações químicas incorporadas no sgRNA. Adaptado de ref. (39)

**Tabela 1S** - Vantagens e desvantagens dos diferentes formatos para a entrega da CRISPR/Cas9. Adaptado de ref. (1,28)

Formato CRISPR/Cas9	Vantagens	Desvantagens
Cas9 + sgRNA	Efeito mais rápido; elevada eficiência; duração transitória; redução de OTEs, da toxicidade e da imunogenicidade	Elevado custo; maior complexidade; contaminação por endotoxinas bacterianas
mRNA da Cas9 + sgRNA	Rapidez de ação; expressão transitória; redução de OTEs e da citotoxicidade	Reduzida estabilidade
Plasmídeo	Baixo custo; simples; elevada estabilidade; evita a transdução de múltiplos componentes	Elevado tamanho; risco de integração genômica; período de latência; dificuldade em atravessar a membrana nuclear; maior risco de OTEs, imunogenicidade e citotoxicidade

**Tabela 2S** - Comparação entre vetores virais e não-virais. Adaptado de ref. (42)

<b>Vetor</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Viral</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Elevada eficiência de transdução</li> <li>2. Tropismo natural para várias células</li> <li>3. Mecanismos intrínsecos para ultrapassagem de barreiras fisiológicas</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Forte imunogenicidade limitando múltiplas administrações</li> <li>2. Potencial integração cromossômica e carcinogenicidade</li> <li>3. Complexidade de concepção e produção</li> <li>4. Limitada capacidade de empacotamento</li> <li>5. Citotoxicidade</li> </ol>
<b>Não-viral</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Reduzida imunogenicidade possibilitando múltiplas administrações</li> <li>2. Facilidade de síntese e produção em larga escala</li> <li>3. Elevada capacidade de encapsulação</li> <li>4. Possibilidade de funcionalização</li> <li>5. Contribuem para um expressão transitória</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Reduzida eficiência de transdução</li> <li>2. Toxicidade em doses elevadas</li> <li>3. Ausência de tropismo intrínseco</li> <li>4. Ausência de mecanismos intrínsecos para ultrapassagem de barreiras fisiológicas</li> </ol>

**Tabela 3S** - Ensaios clínicos CRISPR/Cas9 envolvendo edição *in vivo*. Adaptado de ref. (86)

<b>Doença</b>	<b>Gene-alvo</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Delivery</b>	<b>Início</b>	<b>Fase</b>	<b>Nº Ensaio Clínico</b>
Amaurose congênita de Leber 10	CEP209	EDIT-101	AAV, serótipo 5	Março 2019	Fase I/II	NCT03872479
Ceratite viral herpética refratária	UL8, UL29	BD111	mRNA, partícula lentiviral	Setembro 2020	Fase I/II	NCT04560790
Amiloidose hereditária por transtirretina	TTR	NTLA-2001	mRNA, nanopartícula lipídica	Novembro 2020	Fase I	NCT04601051