



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Irina Marques da Silva Fernandes

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Edição de Bases: o futuro da edição de genes?” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Maria Teresa Pereira, da Dra. Ana Marta Dias e do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2020

Irina Marques da Silva Fernandes

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada "Edição de Bases: o futuro da edição de genes?" referentes à Unidade Curricular "Estágio", sob a orientação da Dra. Maria Teresa Pereira, da Dra. Ana Marta Dias e do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2020

Declaração de Autoria

Eu, Irina Marques da Silva Fernandes, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2015236694, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Edição de Bases: o futuro da edição de genes?” 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 2020.

Irina Marques da Silva Fernandes

(Irina Marques da Silva Fernandes)

Agradecimentos

Aos meus pais e tia,

Por me incentivarem sempre a seguir os meus sonhos e mostrarem que é possível alcançar os meus objetivos. Por todos os ensinamentos que me tornaram na pessoa que hoje sou. Por todo o esforço, tempo e carinho que me dedicaram e facilitaram este árduo percurso.

Às minhas “ladies”, Cardoso, Gisela, Rita e Sofia,

Pelas manhãs de teóricas, pelas tardes de passeios, pelas noites de jogos. Pela amizade que partilhámos e as pelas memórias que criámos. Por todas as conversas que ficam marcadas e pelas sessões de estudo que se prolongavam pelo dia fora, já que noitadas nunca foram o nosso forte.

Às minhas colegas de casa,

Por serem a minha casa em Coimbra. Por serem as irmãs que nunca tive, com quem pude partilhar momentos que ficam para a história. Pelas palavras de motivação e pelos momentos de conforto. Pelo impacto que tiveram na minha vida.

Às farmacêuticas do HDFF, EPE,

Por todos os ensinamentos e desafios que me apresentaram uma nova realidade até então desconhecida, mas à qual ganhei um carinho especial. Por todos os conselhos prestados, que contribuíram para o meu desenvolvimento, pessoal e académico.

A toda a equipa da Farmácia Saúde,

Pelo carinho e amizade com que fui e continuo a ser recebida. Por todos os conhecimentos transmitidos, que me permitiram enriquecer a minha formação. Por me ensinarem a querer ser mais.

Ao Professor Doutor Luís Almeida,

Por todo apoio e orientação. Pela partilha dos seus conhecimentos, sem os quais não seria possível elaborar esta monografia.

A ti, Coimbra,

Por teres cruzado o meu caminho com o de pessoas que me marcaram. Por teres partilhado comigo as tuas tradições. Por teres sido a minha casa neste últimos cinco anos. Por me teres proporcionado os melhores momentos da minha vida.

Success is to be measured not so much by the position that one has reached in life as by the obstacles which he has overcome.

- Booker T. Washington

Índice

PARTE I – Relatório de Estágio em Farmácia Hospitalar

Lista de Abreviaturas	8
1. Introdução.....	9
2. Os Serviços Farmacêuticos do HDFF, EPE	9
3. Análise SWOT	10
3.1 Pontos Fortes.....	11
3.1.1 Recursos humanos e plano de estágio	11
3.1.2 Seleção e aquisição de medicamentos e dispositivos médicos	11
3.1.3 Distribuição de medicamentos.....	12
3.1.4 Cedência de medicamentos em ambulatório.....	15
3.1.5 Hospital de dia e preparação de citotóxicos	15
3.1.6 Colaboração com os Serviços Clínicos.....	16
3.2 Pontos Fracos.....	17
3.2.1 Duração e componente observacional do estágio.....	17
3.2.2 Plano curricular do MICE	17
3.3 Oportunidades	18
3.3.1 Aquisição de conhecimentos através de formações e trabalhos.....	18
3.3.2 Participação em informações farmacêuticas	18
3.4 Ameaças	19
3.4.1 Distanciamento Farmacêutico-Doente	19
3.4.2 Dificuldade de acesso ao setor	20
4. Conclusão	20
5. Referências Bibliográficas.....	21
6. Anexos.....	22

PARTE II – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	32
1. Introdução.....	33
2. A Farmácia Saúde	33
3. Análise SWOT	34
3.1 Pontos Fortes.....	34
3.1.1 Recursos humanos	34
3.1.2 Plano de estágio.....	35
3.1.3 Heterogeneidade de utentes.....	36
3.1.4 Serviços farmacêuticos	36
3.1.5 Preparação Individualizada da Medicação.....	37

3.1.6	Preparação de Medicamentos Manipulados	37
3.2	Pontos Fracos.....	38
3.2.1	Insegurança no aconselhamento ao utente.....	38
3.2.2	Plano curricular do MICEF	38
3.3	Oportunidades	39
3.3.1	Formações.....	39
3.3.2	Unidade curricular Gestão de Informação em Saúde	40
3.4	Ameaças	40
3.4.1	Pandemia SARS-CoV-2.....	40
3.4.2	Iliteracia em saúde dos utentes.....	41
4.	Casos Clínicos.....	41
5.	Conclusão	43
6.	Referências Bibliográficas.....	44
7.	Anexos.....	45
PARTE III – Edição de Bases: o futuro da edição de genes?		
	Resumo	48
	Abstract	49
	Lista de Abreviaturas	50
1.	Introdução.....	51
2.	Da edição de genes à edição de bases.....	52
2.1	Edição de genes: breves considerações e inconvenientes	52
2.2	Edição de bases: uma nova abordagem à edição de genes	53
2.2.1	Desativação da Cas9	53
2.2.2	Editores de bases e sua otimização.....	54
2.2.2.1	Editores da Base Citosina.....	55
2.2.2.2	Editores da Base Adenina	58
2.2.2.3	Comparação dos Editores de Bases.....	59
3.	Estratégias para entrega à célula.....	60
3.1	Vetores Virais.....	61
3.2	Vetores Não Virais.....	62
4.	Aplicações da edição de bases	64
5.	Obstáculos a ultrapassar.....	70
6.	Conclusão	73
7.	Referências Bibliográficas.....	74
8.	Anexos.....	82

PARTE I

Relatório de Estágio em Farmácia Hospitalar

Hospital Distrital da Figueira da Foz, E. P. E.

Sob orientação da Dra. Maria Teresa Pereira



Lista de Abreviaturas

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

AO – Assistente Operacional

CA – Conselho de Administração

CFT – Comissão de Farmácia e Terapêutica

DID em DU – Distribuição Individual Diária em Dose Unitária

DPH – Derivados do Plasma Humano

DT – Distribuição tradicional

EPBs – Estupeficientes, Psicotrópicos e Benzodiazepinas

FH – Farmacêutico Hospitalar

FNM – Formulário Nacional do Medicamento

GHAf com PrEL – Gestão Hospitalar de Aprovisionamento e Farmácia com Prescrição Eletrónica

HDFE, EPE – Hospital Distrital da Figueira da Foz, Entidade Pública Empresarial

INCM – Imprensa Nacional – Casa da Moeda

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

JCM – Justificação Clínica de Medicamentos

JMA – Justificação de Medicamentos Anti-infecciosos

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

PPCIRA – Programa de Prevenção e Controlo de Infecção e Resistências aos Antimicrobianos

SC – Serviços Clínicos

SF – Serviços Farmacêuticos

SPMS – Serviços Partilhados do Ministério da Saúde

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

TSDT – Técnico Superior de Diagnósticos e Terapêutica (Ramo Farmácia)

I. Introdução

O presente relatório corresponde ao estágio realizado em Farmácia Hospitalar, no âmbito da unidade curricular Estágio Curricular, que integra o 2º semestre do 5º ano do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF). O referido estágio foi realizado no Hospital Distrital da Figueira da Foz (HDFF, EPE), de 6 de janeiro de 2020 a 24 de fevereiro de 2020, sob a notável orientação da Dra. Maria Teresa Pereira, Diretora Técnica dos Serviços Farmacêuticos (SF) deste hospital, e coorientação da restante equipa.

O setor hospitalar, em parte por ser uma realidade até então desconhecida, sempre me suscitou interesse dado à multidisciplinariedade da profissão. Deste modo, optei por realizar parte do estágio nesta área, com o intuito de compreender melhor o papel do Farmacêutico Hospitalar (FH), assim como o circuito do medicamento.

Com este relatório, pretendo demonstrar a aplicação dos conhecimentos teóricos, adquiridos durante o MICF, num contexto profissional, e os conhecimentos adquiridos durante o estágio, exemplificando algumas situações práticas que considero relevantes e nas quais tive oportunidade de intervir. Para tal, o relatório consiste numa breve descrição dos SF do HDFF, EPE e numa análise SWOT, que engloba uma dimensão interna, constituída por pontos fortes (*Strengths*) e pontos fracos (*Weaknesses*), e uma dimensão externa, que integra as oportunidades (*Opportunities*) e as ameaças (*Threats*).

2. Os Serviços Farmacêuticos do HDFF, EPE

O HDFF, EPE localiza-se na Gala, concelho da Figueira da Foz, distrito de Coimbra, dispondo de 154 camas na sua totalidade, distribuídas pelos diversos serviços, tais como Medicina Interna, Ortopedia, Cirurgia, entre outros. Os SF funcionam de segunda a sexta-feira, das 9h às 18h, e sábado das 9h às 13h. Fora do horário normal, há sempre um farmacêutico que assegura o serviço, deslocando-se ao hospital sempre que solicitado.

Os SF são departamentos dotados de autonomia técnica e científica, sujeitos à orientação geral do Conselho Administrativo (CA) do hospital. Sendo o foco assegurar que o medicamento correto chegue ao doente correto, na dose correta, pela via de administração correta e em tempo correto, os SF compreendem todas as atividades inerentes à seleção, aquisição, preparação, manipulação, armazenamento e distribuição de medicamentos e outros produtos de saúde. Assim, ao FH, cabe assegurar não só a qualidade dos medicamentos, mas também o seu uso seguro, eficaz e eficiente [1].

No HDFF, EPE, os SF são constituídos por 5 Farmacêuticas, incluindo a Diretora Técnica, 5 Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica (TSDT), 2 Assistentes Operacionais (AO) e 3 Administrativas, sendo que cada elemento possui funções definidas. As farmacêuticas também integram diferentes Comissões Técnicas, nomeadamente, a Comissão de Farmácia e Terapêutica (CFT), a Comissão de Nutrição, o Programa de Prevenção e Controlo de Infecção e Resistências aos Antimicrobianos (PPCIRA) e a Comissão de Ética.

O *software* utilizado é o programa de Gestão Hospitalar de Aprovisionamento e Farmácia com Prescrição Eletrónica (GHAF com PrEL), sendo que os FH têm acesso ao SClinico Hospitalar. Deste modo, é possível um melhor controlo de todo o circuito do medicamento dentro do hospital, assim como aceder ao processo clínico do doente, permitindo uma maior rapidez no esclarecimento de dúvidas na validação das prescrições.

3. Análise SWOT

Com o objetivo de fazer uma avaliação crítica do meu estágio no HDFF, EPE, apresento, de seguida, análise SWOT. Com esta ferramenta pretendo evidenciar tanto os pontos fortes e fracos, como as oportunidades e ameaças que identifiquei durante o estágio.

Tabela I – Análise SWOT relativa ao estágio em farmácia hospitalar, realizado no HDFF, EPE

S	Pontos Fortes <i>Strengths</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Recursos humanos e plano de estágio. • Seleção e aquisição de medicamentos e dispositivos médicos. • Distribuição de medicamentos. • Cedência de medicamentos em ambulatório. • Hospital de dia e preparação de citotóxicos. • Colaboração com os Serviços Clínicos.
W	Pontos Fracos <i>Weaknesses</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Duração e componente observacional do estágio. • Plano curricular do MICF.
O	Oportunidades <i>Opportunities</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Aquisição de conhecimentos através de formações e trabalhos. • Participação em informações farmacêuticas.
T	Ameaças <i>Threats</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Distanciamento Farmacêutico-Doente. • Dificuldade de acesso ao setor.

3.1 Pontos Fortes

3.1.1 Recursos humanos e plano de estágio

Os SF do HDFF, EPE são constituídos por uma equipa de profissionais experientes e dedicados, na qual existe um ambiente de entreaajuda e cooperação. O excelente ambiente foi deveras importante para a minha integração, não só no serviço, mas também na equipa.

Todos colaboradores possuem funções e responsabilidades individuais definidas. Deste modo, foi possível elaborar um plano de estágio completo, em que tive a oportunidade de passar por todos os setores do circuito do medicamento, obtendo informações detalhadas sobre cada um. Tal permitiu-me compreender aprofundadamente as diversas funções que o FH desempenha, essenciais para assegurar a terapêutica medicamentosa aos doentes com critérios de qualidade, segurança, eficácia e eficiência.

3.1.2 Seleção e aquisição de medicamentos e dispositivos médicos

O FH é responsável pela aquisição de medicamentos, produtos farmacêuticos e dispositivos médicos, em articulação com o Serviço de Aprovisionamento. Deste modo, pretende-se assegurar estes produtos aos doentes, com a melhor qualidade e ao custo mais baixo possível [1].

A seleção dos medicamentos a incluir na adenda do HDFF, EPE é feita pela CFT, de acordo com as necessidades terapêuticas dos doentes e com base no Formulário Nacional do Medicamento (FNM). Há medicamentos que constam no formulário do hospital, estando definido quais os que necessitam de JCM ou JMA, como, por exemplo, o Degarrelis e a Colistina, respetivamente. Nestes casos, o médico prescriptor tem de justificar esta utilização, que será analisada pelo farmacêutico. Consoante o medicamento em causa, poderá ser necessário realizar um estudo comparativo entre o medicamento que se pretende utilizar e as alternativas terapêuticas possíveis para as mesmas indicações terapêuticas (Anexo I). Assim, são comparadas indicações terapêuticas, posologia, preço por tratamento, entre outros, concluindo-se o medicamento mais vantajoso, sendo ou não autorizada a sua utilização. Deste modo, é fundamental um estudo de vários medicamentos, permitindo manter uma formação atualizada sobre as terapêuticas disponibilizadas pelo hospital, assim como alternativas a estas.

Contudo, poderá ser necessário utilizar outros medicamentos que não constem no Formulário do Hospital. Tal é possível após uma avaliação, caso a caso, pela CFT, tendo em

conta vantagens, desvantagens e critérios fármaco-económicos relativos ao medicamento em causa. Esta avaliação resulta na inclusão ou não do medicamento na adenda do HDFF, EPE.

Geralmente, os medicamentos são adquiridos por catálogo dos SPMS. Este processo inicia-se com um Concurso Público aberto pelo HDFF, EPE, sendo estabelecido um preço base. Os fornecedores concorrem com as suas propostas, que serão avaliadas por um júri, ao qual pertencem 2 FH. O júri faz a adjudicação ao fornecedor com a melhor oferta, tendo em conta fatores económicos e de qualidade (por exemplo, possibilidade de adaptação a DID em DU). Para medicamentos de uso exclusivo hospitalar, apenas podem ser adquiridos medicamentos que possuam AIM e avaliação prévia do INFARMED. Atualmente, há um grande número de medicamentos que estão em rotura em Portugal, sendo necessário recorrer a medicamentos sem AIM. Nestas situações, é solicitada uma Autorização de Utilização Especial (AUE) ao INFARMED, que autoriza o uso do medicamento importado, durante um determinado período de tempo.

Foi-me possível observar todos os processos inerentes à seleção e aquisição de medicamentos para o HDFF, EPE, processos esses complexos e dificultados pelo elevado número de roturas que subsistem. No entanto, considero este tópico um ponto forte do meu estágio, uma vez que me permitiu adquirir uma maior perceção sobre o importante papel que o FH desempenha, assim como medidas alternativas necessárias, para que nunca falte medicamento ao doente, garantindo a melhor terapêutica possível.

3.1.3 Distribuição de medicamentos

A distribuição dos medicamentos é um ponto crucial no circuito do medicamento, envolvendo uma série de atividades que visam, entre outros, assegurar o cumprimento da terapêutica prescrita ao doente e minimizar erros relacionados com a medicação. Assim, é possível racionalizar custos e garantir a correta administração do medicamento [1]. No HDFF, EPE, existem vários sistemas de distribuição, adaptados ao tipo medicamento, necessidades dos Serviços Clínicos (SC) e dos doentes, que serão descritos de seguida. Estes iniciam-se com uma a prescrição no GHAF, que será validada por um farmacêutico. Quando são detetados erros de prescrição ou sempre que surja questões relativas a, por exemplo, posologia, via de administração, forma farmacêutica, o FH contacta o médico prescriptor.

Distribuição Individual Diária em Dose Unitária (DID em DU)

Este método de distribuição surge com o objetivo de aumentar a segurança no circuito do medicamento, reduzir desperdícios e racionalizar melhor a terapêutica [1], sendo o regime ideal de distribuição, quando aplicável. O FH é responsável por validar a prescrição médica e processar a saída dos produtos farmacêuticos para um período de 24 horas, de segunda a quinta-feira, ou de 72 horas, na sexta-feira. Os serviços validados são enviados para o equipamento semiautomático de armazenamento e distribuição, “Megadosis”, sendo atendido pelo TSDT e transportado para os SC pelo AO, através de módulos de gavetas individuais, identificadas com o nome, processo e número da cama do doente.

Reposição de stock de enfermaria em nome do doente

Caso seja necessário administrar um medicamento imediatamente após a prescrição médica ou fora do horário normal de funcionamento dos SF, recorre-se a stock previamente definido existente nas enfermarias dos SC. Se tal não for possível, a farmacêutica de serviço é contactada. No dia seguinte, é feita uma requisição automática no GHAF, que vai ser atendida pelo TSDT. Este tipo de distribuição pode estar associado a erros, uma vez que o FH apenas valida a prescrição após o medicamento ser administrado. Contudo, é utilizada, uma vez que facilita o acesso ao medicamento, em situações de urgência.

Distribuição tradicional (DT)

Este sistema de distribuição aplica-se a todos os SC e justifica-se sempre que a DID em DU não é viável, tratando-se de produtos de maior volume, como antissépticos, desinfetantes e soros. Contrariamente à DID em DU, a DT é apenas realizada periodicamente, em dias previamente definidos. O enfermeiro do SC faz um pedido pelo GHAF, que será atendido pelo TSDT. À semelhança do método anterior, este processo de distribuição também pode estar associado a dificuldades na racionalização dos produtos, havendo possibilidade de acumulação dos mesmos e conseqüente risco de desperdício por prazo de validade expirado. Comparativamente com a DID em DU, a grande desvantagem da DT é o facto de o FH não ter acesso, na maioria dos casos, à prescrição.

Reposição de stocks por níveis

Atualmente, este tipo de distribuição aplica-se à Unidade de Cirurgia do Ambulatório (UCA). Foram definidos níveis de stocks máximos e mínimos e, quando é atingido o nível mínimo, é despoletada automaticamente uma encomenda de quantidade fixa para repor o stock até ao nível máximo.

Distribuição de medicamentos sujeitos a legislação restritiva

Devido a questões de segurança, há medicamentos que têm de seguir um circuito de distribuição especial, sendo rigorosamente legislados. Destacam-se os estupefacientes, psicotrópicos e benzodiazepinas (EPBs) e os derivados do plasma humano (DPH).

Os EPBs, apesar dos seus benefícios, apresentam risco de induzir habituação e dependência, estando também, normalmente, associados à prática de crimes. Como tal, exigem um controlo mais apertado para garantir a sua correta utilização. Segundo o Decreto-Lei n.º 15/1993 de 22 de janeiro e respetivas alterações, estes medicamentos apenas podem ser dispensados por farmacêuticos. No HDFF, EPE, os EPBs encontram-se armazenados em cofre fechado, segregados dos restantes medicamentos. Cada SC possui um *stock* bem definido, de acordo com as necessidades daquele serviço. Após a administração dos medicamentos deste *stock*, o enfermeiro faz uma requisição em nome do doente, através do Anexo X do modelo n.º 1509, INCM (Anexo 2). Posteriormente, o enfermeiro chefe requisita, no GHAF, a quantidade consumida durante um período de tempo e envia os respetivos Anexos X aos SF.

Os DPH, tais como a Albumina Humana, são legislados pelo Despacho Conjunto n.º 1051/2000, de 14 de setembro. Sendo o plasma humano a matéria-prima para obter estes produtos, há uma elevada preocupação com a transmissão de agentes infetocontagiosos e com a possibilidade de ocorrerem reações adversas. Estes medicamentos são prescritos no GHAF e através do preenchimento do modelo n.º 1804, INCM (Anexo 3). O FH é responsável pela receção, conferência, armazenamento, registo e dispensa do medicamento em causa, garantindo a total rastreabilidade, essencial em situações em que seja necessário verificar o circuito deste produto.

Durante o estágio, foi possível acompanhar e executar as atividades inerentes aos diferentes métodos de distribuição, motivo pelo qual considero este tópico um ponto forte do estágio. Assim, ganhei uma noção aprofundada das diferentes funções que o FH desempenha para assegurar e otimizar este setor do circuito do medicamento. Tive, ainda, a oportunidade de atender diversas requisições de EPBs e DPHs, de forma autónoma. Esta função que desempenhei foi importante, uma vez que me permitiu uma maior proximidade ao medicamento, tendo sido possível familiarizar-me com os diferentes medicamentos.

3.1.4 Cedência de medicamentos em ambulatório

A cedência de medicamentos em ambulatório permitiu uma redução nos custos e riscos associados ao internamento hospitalar, possibilitando que inúmeros doentes continuassem o tratamento em ambiente familiar. Assim, este regime de distribuição tem por objetivo controlar e vigiar a adesão dos doentes ao tratamento e os efeitos secundários graves que possam surgir. Para tal, os SF dispõem de um gabinete de atendimento personalizado, destinado a esta prática, de modo a garantir a confidencialidade dos dados [1].

Esta distribuição inicia-se com uma prescrição eletrónica no GHAF com PrEL, plataforma que permite consultar os dados do doente, o histórico de prescrição e de medicamentos dispensados, entre outros. Para efetuar o levantamento da medicação, é necessária a identificação do utente, comprovada através do cartão de cidadão (do utente ou dos seus cuidadores) e do cartão do hospital do utente. Na primeira cedência, é entregue um folheto informativo (Anexo 4) do medicamento ao doente, acompanhado de uma explicação detalhada sobre a posologia, modo de administração e possíveis efeitos secundários. Os medicamentos são dispensados com periodicidade mensal, à exceção de situações devidamente autorizadas pelo CA. Dentro deste setor, existem vários tipos de cedência de medicamentos, dos quais se destacam os medicamentos legislados (sujeitos a prescrição restrita, para patologias com legislação própria), medicamentos não legislados (que têm de ser previamente autorizados pela CFT e pelo CA), venda de medicamentos (quando não existem no mercado local ou quando não existe Farmácia Comunitária na localidade) e situações especiais como acidentes em serviço e serviço social.

Ao longo do estágio, observei diversos atendimentos em ambulatório, permitindo-me vivenciar o importante papel do FH no controlo da adesão à terapêutica e no aconselhamento ao doente. Adicionalmente, pude assistir a explicações ao utente sobre vários medicamentos, possibilitando aprofundar conhecimentos sobre esquemas terapêuticos até então pouco conhecidos.

3.1.5 Hospital de dia e preparação de citotóxicos

Em abril de 2019, no HDFF, EPE, a preparação de citotóxicos passou a ser da responsabilidade dos SF. Com isto, pretendeu-se maximizar a qualidade consistente do produto obtido, assim como a segurança do manipulador [2]. O HDFF, EPE dispõe de uma sala para preparação destes medicamentos, situada na unidade de hospital de dia. Esta sala é

constituída por uma antecâmara que dá acesso à sala de preparação. Aqui, a farmacotecnia é realizada numa câmara de fluxo laminar vertical.

Para a preparação destes medicamentos, o FH averigua os doentes agendados para o dia seguinte, o técnico prepara os fármacos necessários por doente e o farmacêutico confere. No dia da administração do medicamento, a enfermagem do hospital de dia dá luz verde no GHAF, indicando que o doente está apto a receber o tratamento. O farmacêutico desloca-se à unidade de preparação de citotóxicos, onde se prepara, por doente, os produtos que serão necessários para a manipulação, passando-os por álcool 70°. De seguida, movimenta os produtos por lote. A função do farmacêutico nesta secção passa por supervisionar a farmacotecnia, realizada pelo TSDT, confirmando os volumes a serem utilizados. Por fim, o produto final é entregue às enfermeiras, que irão fazer a administração. O produto é sempre identificado com o nome e processo do doente, assim como os componentes, as doses e a velocidade de administração que nele constam, sendo protegido da luz, caso tal seja necessário.

Considero este setor um ponto forte do meu estágio, dado que me permitiu contactar com uma área desconhecida, tanto em termos práticos como teóricos. Assim, pude enriquecer a minha formação sobre as funções de grande responsabilidade que o FH desempenha na preparação deste tipo de medicamentos, para assegurar a segurança do manipulador e a qualidade do produto.

3.1.6 Colaboração com os Serviços Clínicos

O FH desempenha um papel fundamental no hospital. Sendo o especialista do medicamento, é sua função intervir sempre que for pertinente, assim como informar os diferentes profissionais de saúde em questões relacionadas com o medicamento. No âmbito da informação ativa, tive a oportunidade de assistir a algumas intervenções farmacêuticas, das quais destaco a intervenção 8 que consta no Anexo 5. Nesta situação, o farmacêutico detetou um erro na prescrição, que foi resolvido após diálogo com o médico. Na vertente da informação passiva, foi-me possível assistir e intervir em diversos telefonemas feitos aos SF, como será referido na categoria “Oportunidades”. A título de exemplo, refiro as informações farmacêuticas que constam no Anexo 6.

Face às situações referidas, considero que a colaboração que existe com os diferentes SC constitui uma oportunidade de o FH intervir onde seja oportuno e demonstrar o seu valor

enquanto parte integrante do hospital. Assim, considero um ponto forte do meu estágio o facto de ter sido possível assistir às diversas situações que surgiram, enriquecendo os meus conhecimentos.

3.2 Pontos Fracos

3.2.1 Duração e componente observacional do estágio

Como referido anteriormente, o setor hospitalar era uma área que desconhecia, mas com a qual tive oportunidade de contactar, graças à possibilidade de realizar parte do estágio curricular em farmácia hospitalar. De acordo com as normas orientadoras do estágio, realizei 280 horas, ao longo de 2 meses, nos SF do HDFF, EPE.

Os SF englobam diversos setores, anteriormente elucidados. Aliado ao facto de que as atividades inerentes aos diferentes setores são complexas e constituem uma experiência nova, considero que a duração do estágio foi, efetivamente, curta. Consequentemente, não foi possível realizar as tarefas de maior responsabilidade de forma autónoma, à exceção da cedência de EPBs e DPHs, tendo sido maioritariamente um estágio observacional. Deste modo, julgo que seria vantajoso alargar a duração do estágio, para que a componente prática superasse a observacional, essencial para interiorizar conhecimentos e permitir a adaptação à realidade profissional, com o grau de autonomia que a mesma exige.

3.2.2 Plano curricular do MICF

O plano curricular do MICF proporciona uma grande diversidade de conhecimentos em vários setores das Ciências Farmacêuticas, de entre os quais destaco a Farmácia Comunitária e Indústria Farmacêutica. No entanto, na minha opinião, a área da Farmácia Hospitalar poderia ser mais aprofundada.

Sendo a preparação de citotóxicos uma das funções do FH, penso que seria uma mais valia existir uma unidade curricular para este fim, uma vez que os conhecimentos que o MICF transmite nesta área são escassos. Assim, estaríamos mais familiarizados com esta vertente, sendo possível compreender à partida os diferentes protocolos que se praticam. Do mesmo modo, julgo que o plano curricular deveria contemplar também a área das análises clínicas e nutrição parentérica. Estas são competências essenciais para o FH aquando da validação de prescrições médicas, uma vez que é necessário consultar frequentemente as análises clínicas do doente, no SClínico, de modo a ajustar doses (como, por exemplo, no caso da vancomicina)

e estipular a bolsa de nutrição parentérica mais adequada às necessidades do doente, com base nas suas necessidades proteicas, calóricas, hídricas e eletrolíticas.

3.3 Oportunidades

3.3.1 Aquisição de conhecimentos através de formações e trabalhos

Ao longo do meu estágio, tive a oportunidade de adquirir continuamente diversos conhecimentos. A título de exemplo, destaco a leitura dos Procedimentos Técnicos, que me permitiu interiorizar o modo de funcionamento de cada setor dos SF. Assisti, ainda, a uma formação promovida pela PPCIRA do HDFF, EPE, intitulada “Antissépticos e Desinfetantes”, onde adquiri conhecimentos sobre o tipo de antissépticos e desinfetantes que o HDFF, EPE possui, bem como o seu espectro de ação.

Não obstante, realizei diversos trabalhos, requeridos tanto pela Diretora Técnica como pela restante equipa dos SF. Face ao elevado número de medicamentos em rotura, foi-me solicitada a criação de um ficheiro, com informação recolhida do GHAF e dos arquivos do hospital, onde constam as roturas que se verificaram, desde 2017. Este trabalho permitiu-me ganhar uma noção do elevado número de roturas que existem e do impacto negativo que têm na disponibilização do medicamento ao doente. Outro trabalho que realizei foi elaborar um ficheiro Excel, que indicasse o custo de todos os protocolos de quimioterapia disponíveis no HDFF, EPE, ficheiro que foi apresentado na CFT (Anexo 7). Assim, foi possível familiarizar-me com alguns protocolos de quimioterapia, ampliando os meus conhecimentos na área da oncologia.

3.3.2 Participação em informações farmacêuticas

Como referido anteriormente, assisti a diversas intervenções e informações farmacêuticas que sucederam durante o estágio. Inclusive, tive oportunidade de participar, no âmbito da informação passiva, dando resposta às dúvidas dos profissionais de saúde. Destaco a informação farmacêutica que consta no Anexo 6. Após contacto do serviço de Pediatria, foi-me proposto averiguar se a morfina sob a forma intravenosa poderia passar a ser administrada, por via oral, a crianças.

No seguimento da proatividade do farmacêutico, foi possível participar ativamente na criação de Protocolos de Administração de Metoprolol, Hexafluoreto de Enxofre e Dipiridamol (Anexo 8). O Serviço de Cardiologia do HDFF, EPE implementou um novo teste

de diagnóstico: a ecografia cardíaca transesofágica para deteção de patologias cardíacas mais severas, que requer a utilização de fármacos que não estão disponíveis em Portugal. Assim, foi-me solicitada a criação deste Protocolos de Administração para auxiliar a enfermagem na correta administração destes fármacos.

Deste modo, considero este ponto uma oportunidade que o estágio me proporcionou, uma vez que, ao poder intervir, adquiri novos conhecimentos, demonstrando as minhas capacidades enquanto estagiária.

3.4 Ameaças

3.4.1 Distanciamento Farmacêutico-Doente

Atualmente, o contacto do FH com o doente tem lugar, essencialmente, na cedência de medicamentos em ambulatório. Contudo, o farmacêutico desempenha um papel fundamental na terapêutica do doente, especialmente no momento da validação das prescrições, processo ao qual está associado um grande sentido de responsabilidade.

Para validar a prescrição médica, o FH apenas se pode basear no processo clínico do doente, uma vez que não tem qualquer contacto com o utente. Este distanciamento dificulta o trabalho do farmacêutico, já que os processos clínicos estão frequentemente incompletos. Consequentemente, torna-se difícil fazer uma correta avaliação do estado do doente, de modo a garantir que a medicação prescrita esteja efetivamente adequada. Assim, uma maior proximidade ao doente iria minimizar erros de prescrição *a priori*, tais como possíveis interações medicamentosas e ajustes de doses.

Considero que a falta de recursos humanos contribui para este facto. As poucas farmacêuticas que integram a equipa dos SF do HDFF, EPE desempenham diversas funções morosas, não restando tempo para fazer visitas aos SC. Por ser o especialista do medicamento, é imperativo que o FH tenha uma opinião ativa nas decisões terapêuticas e que volte a realizar as visitas clínicas, eliminando, assim, esta ameaça à nossa profissão. Adicionalmente, a importância do FH poderá ser reconhecida entre, não só os demais profissionais de saúde, mas também o próprio utente.

3.4.2 Dificuldade de acesso ao setor

Apesar da falta de recursos humanos que se verifica no setor da farmácia hospitalar, a situação económica do país não permite novas contratualizações, o que dificulta o acesso a esta área, principalmente por parte de farmacêuticos sem experiência. O FH desempenha um papel importantíssimo em todo o circuito do medicamento, pelo que, como referido no ponto anterior, deve ter mais contacto com o doente. Tal será possível com a expansão dos recursos humanos, uma vez que, ao criar novos postos de trabalho, a dificuldade de ingressar por esta vertente profissional é diminuída. No entanto, recentemente, foi aprovada a Residência Farmacêutica, sendo expectável uma maior facilidade de ingressar na carreira, reforçando, assim, os recursos humanos no SF dos diversos hospitais.

4. Conclusão

A oportunidade de ter realizado um estágio em farmácia hospitalar foi uma experiência enriquecedora, a nível de formação tanto profissional como pessoal. Embora a duração do estágio tenha sido curta, permitiu-me comprovar a importância do farmacêutico em ambiente hospitalar, não só no contexto dos SF, mas também no apoio aos diversos serviços do hospital. Foi-me possível passar por todos os setores dos SF, à medida que fui relembando e, na maior parte das situações, adquirindo novos conhecimentos. A área da oncologia é pouco abordada no plano curricular do MICEF, pelo que tive oportunidade de contactar com este setor e familiarizar-me com os diversos protocolos de quimioterapia, constituindo um grande ponto forte do estágio.

Contudo, apercebi-me de que o farmacêutico é muitas vezes subvalorizado pelos restantes profissionais de saúde. Como tal, é importante reforçar os recursos humanos, de modo a que o farmacêutico consiga realizar, por exemplo, as visitas clínicas, função de elevada relevância da atividade farmacêutica. Consequentemente, seria uma oportunidade de o farmacêutico demonstrar o seu valor e a sua importância no setor hospitalar.

O facto de ter realizado o estágio num hospital pequeno permitiu-me ganhar uma noção mais aprofundada dos diversos setores, assim como ter tido a oportunidade de realizar diversos trabalhos. Estes permitiram-me obter uma perceção de temas atuais, como, por exemplo, o elevado número de roturas que existem e o seu impacto na disponibilização do medicamento ao doente. Assim, e apesar dos pontos fracos e ameaças identificadas, faço um balanço positivo do estágio, como refletido na análise SWOT.

5. Referências Bibliográficas

1. Brou, M. H. L., Feio, J. A. L., Mesquita, E., Ribeiro, R. M. P. F., Brito, M. C. M., Cravo, C., Pinheiro, E. – **Manual da Farmácia Hospitalar**. Ministério da Saúde (2005) [Acedido a 1 de fevereiro de 2020]. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/manual.pdf/a8395577-fb6a-4a48-b295-6905ac60ec6c>
2. Gouveia, A. P. N. M., Silva, A. S. B., Bernardo, D. M. B., Fernandes, J. M. S. S., Martins, M. A. E., Cunha, M. T. F., Borges, S. I. T., Sernache, S. A. M. – **Manual de Preparação de Citotóxicos. Ordem dos Farmacêuticos**. Conselho do Colégio de Especialidade de Farmácia Hospitalar (2013) [Acedido a 15 de fevereiro de 2020]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/publicacoes/manuais/manual-de-preparacao-de-citotoxicos/>

6. Anexos

Anexo I – Estudo comparativo entre o Degarelix e uma alternativa terapêutica (Leuprorrelina)

JCM: Degarelix
Firmagon® 120 mg/80 mg

Nome: J. R.

Nº processo:

Data Nascimento: 79 anos

Diagnóstico: Adenocarcinoma da próstata localmente avançado

Tratamento proposto: Degarelix, Dose inicial de 240 mg administradas sob a forma de duas injeções subcutâneas consecutivas de 120 mg cada, dose de manutenção 80 mg mensalmente.

Histórico do doente: Doente com adenocarcinoma da próstata de grau intermédio (PSA 18.55) com risco cardiovascular elevado

	<i>Degarelix 120 mg/80 mg</i>	<i>Leuprorrelina 22,5 mg</i>
Mecanismo de acção	<p>Degarelix é um antagonista seletivo da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) que se liga de forma competitiva e reversível aos receptores GnRH da hipófise, reduzindo assim rapidamente a libertação das gonadotrofinas, hormona luteinizante (LH) e hormona foliculoestimulante (FSH), e reduzindo consequentemente a secreção de testosterona (T). O carcinoma prostático é conhecido por ser sensível aos androgénios e responder a tratamentos que removam a fonte de androgénio. Ao contrário dos agonistas GnRH, os antagonistas GnRH não induzem um pico de LH com o consequente pico de testosterona/estimulação do tumor e potencial aumento sintomático após o início do tratamento.</p>	<p>O fator de crescimento endotelial vascular-A (VEGF-A) e o fator de crescimento placentar (PIGF) são membros da família VEGF de fatores angiogénicos que podem atuar como potentes fatores mitogénicos, quimiotáticos e de permeabilidade vascular a nível das células endoteliais. O VEGF atua através de dois recetores de tirosina quinases, VEGFR-1 e VEGFR-2, presentes na superfície das células endoteliais. O PIGF liga-se apenas ao VEGFR-1, que também está presente na superfície dos leucócitos. A ativação excessiva destes recetores pelo VEGF-A pode resultar numa neovascularização patológica e permeabilidade vascular excessiva. O PIGF pode ser sinérgico com o VEGF-A nestes processos, sendo também conhecido por favorecer a infiltração leucocitária e a inflamação vascular.</p>

CHNM	CHNM 10096351	CHNM 10042706
Formulário Nacional Medicamentos	SIM	SIM
Formulário do HDFE	Não	Sim
Catálogo da ACSS	Não	SIM
Avaliação prévia	SIM	SIM
Indicações constantes no RCM	FIRMAGON é um antagonista da Hormona Libertadora de Gonadotrofinas (GnRH) indicado para o tratamento de doentes adultos do sexo masculino com cancro da próstata hormono-dependente avançado.	O ELIGARD 22,5 mg está indicado para o tratamento do cancro da próstata avançado hormonodependente e para o tratamento do cancro da próstata de alto risco localizado e cancro da próstata localmente avançado hormono-dependente em combinação com radioterapia.
Posologia	Dose inicial de 240 mg administradas sob a forma de duas injeções subcutâneas consecutivas de 120 mg cada, dose de manutenção 80 mg mensalmente.	O ELIGARD 22,5 mg é administrado trimestralmente como uma única injeção subcutânea.
Advertências e precauções especiais de utilização	<u>Efeito sobre o intervalo QT/QTc</u> O tratamento a longo prazo por supressão androgénica pode prolongar o intervalo QT. No estudo confirmatório de comparação entre o FIRMAGON e a leuprorelina foram realizados eletrocardiogramas (ECGs) periódicos (mensais); ambos os tratamentos revelaram intervalos QT/QTc excedendo 450 msec em aproximadamente 20% dos doentes, e 500 msec em 1% e 2% dos doentes tratados com degarelix e leuprorelina, respetivamente. FIRMAGON não foi estudado em doentes com uma história de intervalo QT corrigido acima de	Reconstituição correta. <u>Terapêutica de privação androgénica pode prolongar o intervalo QT:</u> Em doentes com história ou fatores de risco de prolongamento do intervalo QT e em doentes tratados concomitantemente com medicamentos que podem prolongar o intervalo QT (ver secção 4.5), os médicos devem avaliar a relação benefício-risco, incluindo o potencial de Torsade des pointes antes de iniciar ELIGARD 22,5 mg. <u>Doenças cardiovasculares:</u> Foi notificado, associado ao tratamento com agonistas da GnRH em homens, o risco aumentado de desenvolver enfarte do miocárdio, a morte súbita cardíaca e acidente vascular cerebral.

	450 mseg em doentes com história de ou fatores de risco para torsades de pointes e em doentes a receberem medicação concomitante que poderá prolongar o intervalo QT. Consequentemente nestes doentes a relação benefício/risco do FIRMAGON tem que ser extensivamente avaliada. Um estudo QT minucioso demonstrou que não existe nenhum efeito intrínseco do degarrelix sobre o intervalo QT/QT	O risco parece baixo baseado na notificação através da taxa de probabilidade e deve ser cuidadosamente avaliado, juntamente com fatores de risco cardiovasculares, quando se determina o tratamento para doentes com cancro da próstata. Os doentes que recebem agonistas da GnRH devem ser monitorizados para sintomas e sinais sugestivos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e devem ser tratados de acordo com a prática clínica atual.
Contra indicações	Hipersensibilidade à substância ativa ou a qualquer dos excipientes.	Hipersensibilidade ao acetato de leuprorrelina, a outros agonistas da hormona libertadora da gonadotropina (GnRH) ou a qualquer um dos excipientes
Preço/ tratamento	2 amp 120 mg : 222,56 € 1 amp 80 mg : 124,57€ Custo total 1 ano: 2 amp 120 mg, 11 amp 80 mg: 1592,83 €	1 ampola 22,5 mg = 264,26 Custo total para 1 ano : 1057,04 € (4 amp)

Serviços Farmacêuticos

06/01/2020

Anexo 2 – Anexo X do modelo n° 1509, INCM para requisição de EPBs

REQUISIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E SUAS PREPARAÇÕES COMPREENDIDAS NAS TABELAS I, II, III E IV, COM EXCEÇÃO DA II-A, ANEXAS AO DECRETO-LEI N.º 15/93, DE 22 DE JANEIRO, COM RETIFICAÇÃO DE 20 DE FEVEREIRO

N.º _____

Anexo X

Serviços Farmacêuticos
do

SERVIÇO _____
SALA _____
Código _____

Medicamento (DCI)	Forma farmacêutica	Dosagem	Código

Nome do doente	Cama/ processo	Quantidade pedida ou prescrita	Enfermeiro que administra o medicamento		Quantidade fornecida	Observações
			Rubrica	Data		
<i>Total</i>					<i>Total</i>	

Assinatura legível do diretor do serviço ou legal substituto Data ____/____/____ N.º Mec. _____	Assinatura legível do diretor dos serviços farmacêuticos ou legal substituto Data ____/____/____ N.º Mec. _____	Entregue por (ass. legível) Data ____/____/____ N.º Mec. _____ Recebido por (ass. legível) Data ____/____/____ N.º Mec. _____
--	--	--

Modelo n.º 1509 (Exclusivo da INCM, S. A.) **INCM**

Anexo 3 – Modelo nº 1804, INCM para requisição de DPHs

Número de série 2080163

VIA FARMÁCIA



MINISTÉRIO DA SAÚDE

MEDICAMENTOS HEMODERIVADOS
REQUISIÇÃO/DISTRIBUIÇÃO/ADMINISTRAÇÃO
(Arquivar pelos Serviços Farmacêuticos^())*

HOSPITAL _____
 SERVIÇO _____

Médico _____ <i>(Nome legível)</i> N.º Mec. ou Vinheta _____ Assinatura _____ Data ____/____/____	Identificação do doente <i>(nome, n.º de identificação civil, n.º do processo, n.º de utente do SNS)</i>	QUADRO A
---	---	-----------------

REQUISIÇÃO/JUSTIFICAÇÃO CLÍNICA *(a preencher pelo médico)*

Hemoderivado _____ <i>(Nome, forma farmacêutica, via de administração)</i> Dose/Frequência _____ Duração do tratamento _____ Diagnóstico/Justificação Clínica _____	QUADRO B
--	-----------------

REGISTO DE DISTRIBUIÇÃO N.º _____ / _____ *(a preencher pelos Serviços Farmacêuticos)*

Hemoderivado/dose	Quantidade	Lote	Lab. origem/Fornecedor	N.º Cert. INFARMED

Enviado ____/____/____ Farmacêutico _____ N.º Mec. _____

() Excepcionalmente, o plasma fresco congelado inativado poderá ser distribuído e ter registo e arquivo nos Serviços de Imuno-Hemoterapia.*

Recebido ____/____/____ Serviço requisitante *(Assinatura)* _____ N.º Mec. _____

I. Instruções relativas à documentação:

A requisição, constituída por **2 vias (VIA FARMÁCIA e VIA SERVIÇO)**, é enviada aos Serviços Farmacêuticos após preenchimento dos Quadros A e B pelo serviço requisitante. O Quadro C é preenchido pelos Serviços Farmacêuticos.

VIA SERVIÇO – A preencher pelo serviço requisitante e arquivar no processo clínico do doente.

VIA FARMÁCIA – Permanece em arquivo nos Serviços Farmacêuticos. *Excepcionalmente, a distribuição e registo do plasma fresco congelado inativado, bem como o arquivo da via farmácia, poderá ser feito pelos Serviços de Imuno-Hemoterapia.*

II. Instruções relativas ao produto medicamentoso:

- Cada unidade medicamentosa fornecida será etiquetada pelos Serviços Farmacêuticos com as respetivas condições de conservação e identificação do doente e do serviço requisitante;
- Os produtos não administrados no prazo de 24 horas e atendendo às condições de conservação do rótulo serão obrigatoriamente devolvidos aos Serviços Farmacêuticos. No Quadro D será lavrada a devolução, datada e assinada (n.º mecanográfico).

Despacho n.º 1051/2000 (2.ª série), dos Ministérios da Defesa Nacional e da Saúde, publicado no Diário da República, 2.ª série, n.º 251, de 30 de outubro de 2000.

Anexo 4 – Folheto informativo do Anastrozol 1 mg, entregue aquando da cedência em Ambulatório

- ❖ Conserve este folheto. Pode ter necessidade de o reler.
- ❖ Caso ainda tenha dúvidas, consulte o seu médico ou farmacêutico.
- ❖ Este medicamento foi receitado para si. Não deve dá-lo a outros; o medicamento pode ser-lhes prejudicial mesmo que apresentem os mesmos sintomas.



Os medicamentos não devem ser eliminados na canalização ou no lixo doméstico.

Pergunte ao seu farmacêutico como eliminar os medicamentos de que já não necessita.

Estas medidas irão ajudar a proteger o ambiente.

Se algum dos efeitos secundários se agravar ou se detectar quaisquer efeitos secundários não mencionados neste folheto, informe o seu **médico** ou **farmacêutico**.



Contactos

Serviços Farmacêuticos, HDFS,EPE

Telefone:
233 402 000 - extensão: 591
E-mail:
farmacia@hdfigueira.min-saude.pt
Fax:
233 431 862

<http://www.hdfigueira.min-saude.pt/>

Serviços Farmacêuticos



Anastrozol 1 mg

FOLHETO INFORMATIVO

INFORMAÇÃO PARA O DOENTE

Pag. 1/2
I.02.1

1. O que é Anastrozol e para que é utilizado?

Anastrozol pertence a um grupo de medicamentos denominados “inibidores da aromatase” e é utilizado para tratar o cancro da mama em mulheres na pós-menopausa. Reduz a quantidade de uma hormona designada por estrogénio que o corpo produz através do bloqueio de uma substância natural (uma enzima) que existe no corpo chamada “aromatase”.

2. Antes de tomar Anastrozol:

Informe o seu médico se:

- Ainda é menstruada e não estiver na menopausa;
- Tem problemas hepáticos ou renais graves ou moderados;
- Está a tomar um medicamento chamado tamoxifeno ou medicamentos que contêm estrogénio;
- Sofre de doença que afecte a resistência óssea (osteoporose);
- Está grávida ou a amamentar.

3. Ao tomar Anastrozol com outros medicamentos:

Informe o seu médico ou farmacêutico se estiver a tomar ou tiver tomado recentemente outros medicamentos, incluindo medicamentos obtidos sem receita médica e/ou à base de plantas.

É especialmente importante mencionar:

- Tamoxifeno (cancro da mama),
- Medicamentos que contenham estrogénios (como a terapêutica hormonal de substituição);
- Medicamentos utilizados para tratar o cancro da mama, determinadas doenças ginecológicas e infertilidade (gonadorrelina, busserrelina, goserrelina e triptorelina).

4. Como tomar Anastrozol:

Salvo outra indicação médica, deve tomar um **comprimido uma vez por dia**, preferencialmente sempre à mesma hora.

Os comprimidos devem ser engolidos inteiros, com um copo de água.

A toma pode ser efectuada antes, durante ou após as refeições.

Caso se tenha esquecido de tomar o comprimido à hora habitual, não tome uma dose a dobrar para compensar uma dose que se esqueceu. Espere pela hora da próxima toma e continue a tomar de acordo com o prescrito pelo seu médico.

O tratamento é prolongado e pode manter-se durante vários anos.

Não pare de tomar este medicamento mesmo que se sinta saudável, a menos que o seu médico lhe tenha dito para suspender o tratamento.

5. Efeitos secundários possíveis:

Afrontamentos;
Dor ou rigidez das articulações;
Reacções alérgicas na pele;
Diarreia;
Dor de cabeça;
Náuseas;
Enfraquecimento moderado do cabelo;
Perda de apetite;
Hemorragia vaginal (geralmente durante as primeiras semanas do tratamento – se a hemorragia persistir deve contactar o seu médico)
Secura vaginal;
Síndrome do túnel cárpico (adormecimento ou sensação de formigueiro, frio, dor, fraqueza em partes da mão);
Sensação de fraqueza /sonolência.

Pag. 2/2
I.02.1

Como algumas pessoas podem ter sensação de fraqueza e/ou sonolência durante o tratamento com este medicamento, deverá ter cuidado enquanto conduz ou opera máquinas.

6. Como conservar Anastrozol:

Manter fora do alcance e da vista das crianças.

Conservar na embalagem de origem ao abrigo do calor e da luz.

Não utilizar após o prazo de validade impresso na embalagem exterior.

O prazo de validade corresponde ao último dia do mês indicado.

7. Outras informações:

Os comprimidos de Anastrozol contêm lactose. Se foi informado pelo seu médico que tem intolerância a alguns açúcares, contacte-o antes de tomar este medicamento.

Anexo 5 – Registo de intervenções farmacêuticas



SERVIÇO FARMACÊUTICO

Intervenções Farmacêuticas 2020					
	Farmacêutica	Diálogo com o profissional	Situação Fármaco/posologia	Proposta do farmacêutico/Intervenção farmacêutica	Resultado da intervenção
8	Data: 15/01/2020 Serviço: Esp Cir Nº Processo:25000487 Teresa Pereira	Dra [REDACTED]	Foi dada indicação pelo Dr [REDACTED] (CDP) para realização de profilaxia da TB com piridoxina 40 mg e isoniazida 300 mg. No formulário do HDFF só está disponível piridoxina 300 mg	Como a piridoxina 300 mg permite fracionamento propõe-se o uso de 150 mg 2 ou 3x/semana.	Aceite. Realização de 150 mg de piridoxina 3x semana
9	Data: 15/01/2020 Serviço: Esp Cir Nº Processo:25000487 Vânia Pereira	Dra [REDACTED]	Piridoxina 150 mg 24/24 H solução oral	Ver anterior. No seguimento foi prescrito: Piridoxina 150 mg 24/24 H solução oral.	Aceite. Realização de 150 mg de piridoxina 3x semana

Anexo 6 – Registo de informações farmacêuticas



SERVIÇO FARMACÊUTICO

REGISTO DE INFORMAÇÃO FARMACÊUTICA	
SERVIÇO:	Pediatría
	DATA: 07/01/2020
PROFISSIONAL:	Enfª [REDACTED] / Drª [REDACTED]
	PEDIDO A OUTRA ENTIDADE:
DESCRIPÇÃO:	
<p>O Serviço de Pediatria pretende elaborar um de Procedimento para a dor aguda em crianças, onde deveria constar a Morfina numa formulação oral líquida, fármaco inexistente no Formulário do Hospital.</p>	
RESUMO DAS QUESTÕES COLOCADAS:	
<p>1. A Morfina injetável existente no hospital pode ser administrada por via oral? 2. Caso não seja possível, qual a solução?</p>	
RESPOSTA:	
<p>Após pesquisa nos RCM da morfina injetável e contacto com os diretores técnicos dos laboratórios fornecedores deste medicamento, conclui-se não haver informação disponível nem trabalhos que sustentem a possibilidade de administrar este medicamento por via oral, com garantia.</p> <p>Após contacto com os CHUC, informaram-nos que a Technimed comercializava morfina em solução oral (Oramorph 20 mg/mL), pelo que se solicitou preços. Perante o valor de encomenda mínima exigido para aquisição deste estupefaciente, fica inviabilizada a sua aquisição dada a baixa previsão de consumo.</p> <p>Após diálogo com o Diretor de Serviço, Dr. [REDACTED], fica decidido a possibilidade de aquisição à Farmácia Comunitária aquando necessário, respeitando os requisitos legais.</p>	
O/A RESPONSÁVEL:	Teresa Pereira/Irina Fernandes
	MEC. N.º: 1015

Anexo 7 – Trabalho preços dos protocolos de quimioterapia

Preços com IVA por protocolo (assumindo $m^2 = 1,7$ e peso do doente = 70 kg)

Carcinoma do Estômago			
ELF (Etoposido + Levofolinato de Cálcio + 5-Fu)			
Fármaco	Dose	Preço	Preço total
Cloreto de Sódio 0,9%	1000 ml	0,99 €	43,54 €
Ondansetrom IV	8 mg	0,30 €	
Etoposido	120 mg/m^2	15,54 €	Preço 3 dias
Levofolinato de Cálcio	150 mg/m^2	19,62 €	130,62 €
5-Fluorouracilo	500 mg/m^2	5,98 €	
Cloreto de Sódio 0,9%	500 ml	0,50 €	
Cloreto de Sódio 0,9%	50/100 ml	0,61 €	

CF (Cisplatina + Levofolinato de Cálcio + 5-Fu)			
Fármaco	Dose	Preço	Preço total
Cloreto de Sódio 0,9%	500 ml	0,99 €	83,40 €
Cloreto de Potássio 7,5%	40 ml	2,72 €	
Sulfato de Magnésio 20%	40 ml	2,78 €	
Aprepitant	125 mg	13,25 €	
Ondansetrom IV	8 mg	0,30 €	
Dexametasona	12 mg	1,29 €	
Cisplatina	50 mg/m^2	9,07 €	
Levofolinato de Cálcio	200 mg/m^2	19,62 €	
5-Fluorouracilo	400 mg/m^2	5,98 €	
5-Fluorouracilo	2400 mg/m^2	5,98 €	
Aprepitant	80 mg	15,90 €	
Dexametasona	8 mg	1,29 €	
Cloreto de Sódio 0,9%	1000 ml	1,98 €	
Cloreto de Sódio 0,9%	100 ml	0,32 €	
Cloreto de Sódio 0,9%	250 ml	1,32 €	
Cloreto de Sódio 0,9%	50/100 ml	0,61 €	

Carcinoma Colorretal			
FOLFOX (Oxaliplatina + 5-Fu + Levofolinato de Cálcio)			
Fármaco	Dose	Preço	Preço total
Glucose 5%	1000 ml	0,85 €	55,20 €
Ondansetrom IV	8 mg	0,30 €	
Dexametasona	20 mg	5,84 €	
Oxaliplatina	85 mg/m^2	13,08 €	
Levofolinato de Cálcio	200 mg/m^2	19,62 €	
5-Fluorouracilo	400 mg/m^2	5,98 €	
5-Fluorouracilo	2400 mg/m^2	5,98 €	
Ondansetrom	8 mg	0,70 €	
Cloreto de Sódio 0,9%	100 ml	0,32 €	
Glucose 5%	250 ml	1,48 €	
Cloreto de Sódio 0,9%	50/100 ml	0,61 €	
Cloreto de Sódio 0,9%	250 ml	0,44 €	

FOLFOX (Oxaliplatina + 5-Fu + Levofolinato de Cálcio) - Diabéticos			
Fármaco	Dose	Preço	Preço total
Cloreto de Sódio 0,9%	1000 ml	0,99 €	56,52 €
Ondansetrom IV	8 mg	0,30 €	
Dexametasona	20 mg	5,84 €	
Glucose 5%	100 ml	0,59 €	
Oxaliplatina	85 mg/m^2	13,08 €	
Levofolinato de Cálcio	200 mg/m^2	19,62 €	
Glucose 5%	100 ml	0,59 €	
5-Fluorouracilo	400 mg/m^2	5,98 €	
5-Fluorouracilo	2400 mg/m^2	5,98 €	
Ondansetrom	8 mg	0,70 €	
Glucose 5%	250 ml	1,48 €	
Cloreto de Sódio 0,9%	50/100 ml	0,61 €	
Cloreto de Sódio 0,9%	250 ml	0,44 €	
Cloreto de Sódio 0,9%	100 ml	0,32 €	

Anexo 8 – Protocolo de Administração do Dipiridamol



Hospital Distrital da
Figueira da Foz, E.P.E.

SERVIÇOS FARMACÊUTICOS

Preparação e Administração

Dipiridamol 10 mg/2 ml (Persantin® i.v.)

Indicações	<ul style="list-style-type: none">- Auxiliar de testes diagnósticos de esforço (teste ergométrico), na avaliação da perfusão miocárdica com tálío.- Auxiliar na ecografia de stress para avaliação de coronariopatias isquémicas
Apresentação	<p>Cada ampola de 2 ml contém:</p> <ul style="list-style-type: none">- 10 mg de Dipiridamol <p>Excipientes: ácido tartárico, macrogol, ácido clorídrico, água para injetáveis</p> <p>A solução é clara, amarela e praticamente isenta de partículas.</p>
Reconstituição	<p>Antes da infusão intravenosa, o dipiridamol deve ser diluído em solução de cloreto de sódio a 0.45% ou 0.9%, ou em solução glicosilada a 5%, numa proporção mínima de 1:2, para produzir um volume total de, aproximadamente, 20 a 50 ml. A infusão de dipiridamol não diluído pode provocar irritação local.</p>
Administração	<p>A dose intravenosa de dipiridamol como adjuvante na avaliação da perfusão miocárdica por tálío deve ser ajustada de acordo com o peso do doente. A dose recomendada é de 0.142 mg/kg/minuto, infundida durante 4 minutos. A dose máxima é de 0.84 mg/kg, infundida durante 6-10 minutos. Não se recomenda exceder a dose máxima. O tálío-201 deve ser injetado no prazo de 5 minutos após a infusão de 4 minutos de dipiridamol.</p>
Incompatibilidades	<p>Não deve ser misturado com outros fármacos na mesma seringa nem no mesmo frasco de infusão.</p>
Conservação	<p>Manter à temperatura ambiente (15°C a 30°C), protegido da luz e da humidade.</p> <p>Antes de usar, observar o aspeto do medicamento.</p>
Bibliografia	<p>RCM do medicamento</p>

Data: 21/01/2020

O Farmacêutico: Teresa Pereira]

PARTE II

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Saúde

Sob orientação da Dra. Ana Marta Dias



Lista de Abreviaturas

DCI – Denominação Comum Internacional

FS – Farmácia Saúde

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MSRM – Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

PIM – Preparação Individualizada da Medicação

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

I. Introdução

No seguimento da unidade curricular Estágio Curricular, realizei a segunda parte do meu estágio em Farmácia Comunitária. Este estágio teve lugar na Farmácia Saúde (FS), na Figueira da Foz, de 2 de março de 2020 a 31 de agosto de 2020, orientado pela Dra. Ana Marta Dias e coordenação da restante equipa.

O Farmacêutico Comunitário é um profissional de saúde altamente competente em farmacoterapia [1]. Assim, a sua principal responsabilidade passa por promover um tratamento com qualidade, eficácia e segurança, visando a saúde e bem-estar do doente e do cidadão em geral [2]. Para tal, é fundamental aliar uma boa preparação teórica à prática. Consequentemente, o estágio curricular representa um elo de ligação entre ambas as componentes, permitindo ao aluno contactar com a realidade profissional, ainda que num ambiente de aprendizagem.

Este relatório consiste numa breve descrição da Farmácia Saúde e numa análise SWOT, constituída por pontos fortes (*Strengths*) e pontos fracos (*Weaknesses*), que integram a dimensão interna, e por oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*), que constam na dimensão externa. Assim, a finalidade do relatório passa por demonstrar a consolidação de conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do MICF, assim como a aquisição de novos conhecimentos noutras nas mais diversas vertentes que constituem a farmácia comunitária.

2. A Farmácia Saúde

A FS está localizada no centro comercial E. Leclerc, na Figueira da Foz, tendo como horário de funcionamento, de segunda a sábado, das 9h as 20h, e das 9h às 13h, aos domingos e feriados (exceto no verão, em que o domingo partilha do mesmo horário da restante semana). Adicionalmente, como definido pela Administração Regional de Saúde do Centro, I.P. (ARSC), realiza serviço de regime permanente, a cada 13 dias. A FS encontra-se inserida na rede Farmácias Portuguesas da Associação Nacional das Farmácias (ANF), dispondo dos serviços inerentes a esta, tais como o cartão Saúde e o Sifarma 2000®.

A equipa da FS conta com 17 elementos, entre eles, 8 farmacêuticos, 4 técnicos de farmácia (licenciados), 1 técnico de farmácia, 2 técnicas auxiliares de farmácia e 2 técnicas indiferenciadas. A direção técnica é da responsabilidade da Dra. Anabela Mascarenhas, proprietária conjunta com o Engenheiro Flávio Maia.

3. Análise SWOT

Segue-se uma análise SWOT relativa ao meu estágio na Farmácia Saúde. Através desta análise, foi-me possível fazer uma avaliação crítica do estágio, com base em pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças que identifiquei no decorrer do estágio.

Tabela I – Análise SWOT relativa ao estágio realizado na Farmácia Saúde

S	Pontos Fortes <i>Strengths</i>	<ul style="list-style-type: none">• Recursos humanos.• Plano de estágio.• Diversidade de utentes.• Serviços farmacêuticos.• Preparação Individualizada da Medicação.• Preparação de Medicamentos Manipulados.
W	Pontos Fracos <i>Weaknesses</i>	<ul style="list-style-type: none">• Insegurança no aconselhamento ao utente.• Plano curricular do MICEF.
O	Oportunidades <i>Opportunities</i>	<ul style="list-style-type: none">• Formações.• Unidade curricular Gestão de Informação em Saúde.
T	Ameaças <i>Threats</i>	<ul style="list-style-type: none">• Pandemia SARS-CoV-2.• Iliteracia em saúde dos utentes.

3.1 Pontos Fortes

3.1.1 Recursos humanos

A equipa da FS é dotada de profissionais experientes, na qual predomina a boa disposição e entreatada. O facto de ter realizado um estágio de verão neste local, facilitou a minha integração na equipa, tornando a adaptação a esta realidade profissional mais rápida.

Embora a autonomia seja fortemente encorajada, toda a equipa da FS sempre se demonstrou prontamente disponível para esclarecer qualquer dúvida que surgisse em qualquer fase do estágio. Considero que esta realidade foi devesas importante para a minha aprendizagem, uma vez que sempre me senti à vontade para expor qualquer tipo de questões.

Cada elemento da equipa está direcionado para uma vertente específica, tal como a veterinária, ortopedia e puericultura, sendo, por isso, dotado de conhecimentos aprofundados nessa mesma área. Adicionalmente, há profissionais responsáveis por certos setores, como, por exemplo, a preparação individualizada da medicação (PIM), a manipulação de medicamentos, gestão de encomendas, entre outros. Por conseguinte, ao longo do estágio, tive oportunidade de obter explicações mais detalhadas sobre os diferentes produtos da

farmácia, assim como os diversos processos inerentes à rotina do farmacêutico, o que possibilitou adquirir e aprofundar conhecimentos em diversas áreas.

3.1.2 Plano de estágio

O plano de estágio sugerido pela FS visa uma familiarização com o espaço e o sistema informático Sifarma 2000[®], motivo pelo qual considero um ponto forte do meu estágio. Para tal, pode ser dividido em três fases, a seguir explanadas.

Numa primeira fase, com cerca de 1 mês de duração, as minhas funções passaram pelo *back-office*. Procedi ao armazenamento de medicamentos e outros produtos, seguindo o método “*first expired, first out*”, gestão de encomendas e devoluções, controlo de prazos de validade e reposição de *stocks*. Na FS, os medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) estão armazenados em gavetas, consoante a forma farmacêutica (comprimidos, pomadas, pós, etc.) e de acordo com a via de administração a que se destinam (ginecológicos, injetáveis, oftalmológicos, etc.). Os medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) estão organizados em prateleiras e gavetas, sendo expostos consoante a sua sazonalidade. Com exceção dos comprimidos e cápsulas, todos os MNSRM no *backoffice* e os restantes MSRM estão organizados por ordem alfabética de marca. Os MSRM de exceção estão organizados por Denominação Comum Internacional (DCI).

Assim, esta fase inicial é uma fase de adaptação, essencial a um bom desempenho a nível do atendimento, dado que permite ao estagiário contactar em primeira mão com os medicamentos antes de passar para o *front-office*. Por sua vez, já há uma boa noção da disposição dos produtos e a associação marca-DCI é, também, facilitada.

A segunda fase do estágio passa pela observação dos atendimentos. Foi-me possível realizar as operações necessárias no Sifarma 2000[®], enquanto atentava o aconselhamento por parte do farmacêutico nas diversas situações que surgiam. Considero que esta fase de transição foi crucial para o restante estágio, visto que me permitiu adquirir/consolidar conhecimentos quanto ao aconselhamento, além de permitir a minha adaptação ao sistema informático.

O plano de estágio culmina numa terceira e última fase, caracterizada pelo atendimento autónomo supervisionado pelo farmacêutico presente. Desta forma, tive oportunidade de aplicar todos os conhecimentos que fui adquirindo ao longo do MICE e do estágio curricular.

3.1.3 Heterogeneidade de utentes

Como referido anteriormente, a FS está localizada no centro comercial E. Leclerc, o que permite uma fácil acessibilidade à farmácia, devido à elevada quantidade de lugares de estacionamento. Este fator aliado à densa área populacional onde se insere e ao horário alargado da FS, traduzem-se numa grande diversidade de utentes, tanto em termos de faixa etária como de estratos socioeconómicos.

Esta heterogeneidade de utentes constituiu um grande desafio e uma mais valia na minha aprendizagem durante o estágio por vários motivos. Consegui desenvolver capacidades de adaptação e personalização do meu discurso consoante o tipo de utente que atendia, de modo a garantir que a informação que passava era bem recebida e compreendida. Do mesmo modo, permitiu-me consolidar conhecimentos nas mais variadas áreas da farmácia comunitária. Por exemplo, o utente habitual (normalmente idoso), está interessado na medicação que toma cronicamente, como é o caso de antihipertensores, antidiabéticos, etc. Já o utente esporádico tem maior interesse em resolver uma patologia transitória (tosse, constipação, alergia, queimadura) ou procura um aconselhamento de puericultura e dermocosmética. Por outro lado, dado que o estágio curricular abrangeu os meses de verão, tive oportunidade de contactar com utentes de diferentes nacionalidades, o que constituiu uma oportunidade de comunicar noutra língua.

3.1.4 Serviços farmacêuticos

Atualmente, a farmácia tem um grande impacto na saúde do doente, dado que é um local onde é possível avaliar a adesão do utente à terapêutica, a sua correta administração e se o seu efeito é o pretendido, além de ser um local onde o bem-estar geral do doente é prioridade. Existe uma elevada prevalência de doentes hipertensos, diabéticos e/ou hipercolesterolémicos na população, pelo que é fundamental avaliar os parâmetros bioquímicos de forma a vigiar estas patologias e, também, a adesão à terapêutica. Do mesmo modo, os utentes preocupam-se cada vez mais com a sua saúde e são proativos na medida em que vão regularmente à farmácia avaliar os diversos parâmetros.

A FS fornece aos utentes a possibilidade de realizar diversos testes, com o intuito de avaliar o seu estado de saúde geral. Falamos, então, de medições da pressão arterial, glicémia e colesterol. Além destes, é ainda possível medir o INR, para ajuste de dose em doentes que tomam varfarina ou acenocumarol, e realizar testes à urina, de modo a despistar alguma infeção urinária.

Durante o estágio tive oportunidade de realizar/observar os referidos testes aos utentes, interpretando os resultados e esclarecendo eventuais dúvidas que estes apresentavam relativamente à medicação que estavam a tomar.

3.1.5 Preparação Individualizada da Medicação

A principal função do farmacêutico comunitário é assegurar a utilização correta, segura e efetiva do medicamento [3]. Contudo, muitas vezes verifica-se a não adesão à terapêutica, que pode ter na sua génese diversas causas. Uma das mais comuns são os regimes terapêuticos complexos ou pessoas que possuam algum tipo de limitação, seja ela física ou cognitiva, que acaba por constituir uma barreira à toma da medicação de forma correta. Este tipo de não adesão não intencional pode ser minimizada através da intervenção do farmacêutico, com recurso à Preparação Individualizada da Medicação (PIM).

A PIM consiste na utilização de caixas dispensadoras para organização, pelo farmacêutico, da medicação do utente. Assim, a medicação de forma farmacêutica sólida para uso oral que integra o regime terapêutico do utente é disposta por dia da semana e por altura do dia em que deve ser tomada (jejum, almoço, deitar, etc), de acordo com a posologia prescrita (Anexo I).

Atualmente, na FS, a PIM é elaborada para utentes mais idosos cujas limitações e complexidade dos regimes terapêuticos os impedem de gerir corretamente a sua medicação diária. Este serviço, no qual tive oportunidade de participar ativamente na sua execução, torna-se uma excelente ferramenta para auxiliar o utente, uma vez que, através de dispensadores semanais ou mensais, o utente dispõe de toda a medicação necessária, sem haver dúvidas no horário da toma dos medicamentos.

3.1.6 Preparação de Medicamentos Manipulados

Apesar da grande diversidade de medicamentos que existem atualmente no mercado, há algumas situações para as quais não há opções terapêuticas adequadas. São exemplos a inexistência da substância ativa na forma farmacêutica pretendida e a necessidade de adaptação de dosagens ou formas farmacêuticas a populações como a geriatria e a pediatria [4].

A FS tem instalações e pessoal qualificado para a preparação de manipulados, tendo muitas requisições para esse efeito, tanto a nível de MSRM como MNSRM, tais como champô sólido, bálsamos labiais, suplementos, entre outros. Assim, durante o estágio, tive

oportunidade de assistir e intervir na preparação de álcool gel, de um creme de piperina 4% e uma suspensão de propranolol 5 mg/mL.

Apesar de não ter sido possível intervir na preparação de mais manipulados, considero que as preparações que fiz foram uma ótima oportunidade para recordar conhecimentos de farmácia galénica e aprofundar conhecimentos na área da manipulação, no que diz respeito a preços e técnica.

3.2 Pontos Fracos

3.2.1 Insegurança no aconselhamento ao utente

Atualmente, os utentes são cada vez mais exigentes, pretendendo ser atendidos com a maior qualidade, no menor tempo possível. Consequentemente, durante a fase inicial de atendimento ao balcão, senti alguma insegurança em realizar atendimentos, uma vez que receava transmitir alguma informação incorreta ao utente ou até mesmo enganar-me ao realizar as operações no Sifarma 2000®.

No entanto, a equipa da FS esteve sempre disposta a esclarecer qualquer tipo de dúvidas, auxiliando-me a superar esta insegurança inicial e a desenvolver autonomia no aconselhamento ao utente.

3.2.2 Plano curricular do MICF

Ao MICF, está associado um plano curricular vasto, caracterizado por uma grande diversidade de unidade curriculares que visam abranger todas as saídas profissionais possíveis que o curso oferece. Por um lado, este fator é uma mais-valia para o estudante, na medida em que nos permite ter noção das diferentes áreas do mercado de trabalho que podemos seguir, sendo possível adquirir bastantes conhecimentos em cada área. Porém, torna-se também um ponto fraco, visto que não permite uma preparação completa e aprofundada para uma saída profissional específica, a seguir fundamentado.

Áreas como a suplementação alimentar e dispositivos médicos apenas são abordadas em unidades curriculares opcionais. No entanto, considero que estas são matérias de elevada importância na farmácia comunitária, dado que eram muitas vezes solicitados, por exemplo, suplementos para combater a falta de atenção, falta de memória e fadiga, entre outras. Sendo

estas preocupações transversais à maioria dos utentes, considero que estes temas não deveriam ser de carácter opcional.

Do mesmo modo, na unidade curricular de Preparações de Uso Veterinário, deveriam ser abordadas de forma mais aproximada ao dia a dia numa farmácia, dado que o desconhecimento dos produtos de uso veterinário era notório. Numa fase inicial do atendimento ao balcão, tive de recorrer à ajuda de um farmacêutico para aconselhar o utente da melhor maneira possível.

Por fim, dado que todos os estudantes contactam com a área da farmácia comunitária, considero vantajosa a introdução mais componentes práticas ao longo do curso, tais como estágios de verão. Isto permitirá um prévio contacto com esta área, sendo possível ambientarmo-nos à vasta gama de produtos disponíveis na farmácia, assim como consolidar conhecimentos à medida que são lecionados, permitindo uma adaptação mais rápida aquando do início do estágio curricular.

Não obstante, sendo o estágio curricular um momento de aprendizagem, procurei sempre aprofundar os meus conhecimentos, tanto através de exposição de dúvidas à equipa da FS, como através de formações e consulta de documentos.

3.3 Oportunidades

3.3.1 Formações

O farmacêutico deve estar constantemente atualizado quanto a novos produtos e tratamentos que vão surgindo. Para tal, na FS, a participação da equipa em formações é bastante incentivada.

Durante o estágio, tive oportunidade de assistir a diversas formações nas mais variadas áreas (Anexo 2). Isto foi crucial para aprofundar e alargar os meus conhecimentos sobre produtos existentes no mercado e em áreas como a veterinária, dermocosmética, suplementos, entre outros. Por sua vez, foi notória a autonomia desenvolvida no aconselhamento ao utente, sentindo-me mais segura e confiante na informação que passava.

3.3.2 Unidade curricular Gestão de Informação em Saúde

No 5º ano do MICEF, o estudante tem oportunidade de escolher uma unidade curricular opcional, com a finalidade de complementar a sua formação numa dada vertente. Ao realizar um estágio de verão no 3º ano, notei que a farmácia comunitária abrange uma grande diversidade de produtos que ainda não tinham sido abordados. Por conseguinte, decidi optar pela unidade curricular opcional Gestão de Informação em Saúde.

Esta unidade curricular demonstrou ser uma mais-valia na minha formação e, conseqüentemente, no meu desempenho durante o estágio. Foram abordados temas como suplementação alimentar, ortopedia e homeopatia, o que permitiu colmatar lacunas no meu conhecimento. Além disso, foi possível consolidar e complementar conhecimentos lecionados noutras unidades curriculares, nomeadamente na área da veterinária, dermocosmética, puericultura e material de penso.

3.4 Ameaças

3.4.1 Pandemia SARS-CoV-2

Devido à pandemia do vírus SARS-CoV-2, em Portugal, foi declarado Estado de Emergência no dia 20 de março. Tal obrigou a uma interrupção do estágio, desde essa data até dia 4 de maio.

Como os conhecimentos da fase inicial do estágio (que compreendeu as tarefas inerentes ao *back-office*) ainda não estavam bem consolidados, tiveram de ser relembrados aquando do recomeço do estágio. Do mesmo modo, a FS teve de se adaptar a esta nova realidade. Para tal, a equipa foi dividida, trabalhando em semanas alternadas. Dado que éramos 4 estagiárias, seguimos também este horário, durante o mês de maio. Posteriormente, o estágio decorria em apenas 2 ou 3 dias por semana, uma vez que não era permitido aglomerados em espaços fechados e a FS já possuía uma vasta equipa. Todos estes fatores se tornaram uma ameaça no decorrer do estágio, dado que o processo de aprendizagem se tornou mais lento. Adicionalmente, a quantidade e diversidade de utentes que frequentavam a farmácia foi também drasticamente reduzida, visto que a população optava por sair menos vezes de casa e apenas para situações estritamente necessárias. Por conseguinte, a heterogeneidade de casos que surgiam foi diminuída, o que dificultou a transposição de alguns conhecimentos teóricos para a prática.

3.4.2 Iliteracia em saúde dos utentes

Literacia em saúde é definida, pela Organização Mundial da Saúde, como o conjunto de “competências cognitivas e sociais que determinam a motivação e capacidade dos indivíduos acederem, compreenderem e usarem informação de forma a promover e manter boa saúde” [5]. Por conseguinte, como profissionais de saúde especialistas do medicamento, temos o dever de fornecer informações complementares à terapêutica, que visem o correto uso dos medicamentos, assim como alertar para possíveis efeitos adversos que possam surgir. Durante o meu estágio, tive oportunidade de pôr em prática estas premissas, averiguando se o medicamento solicitado era a melhor opção para a condição em causa e informando o utente do seu correto uso.

Contudo, em diversas situações, foi-me solicitado um MNSRM específico, motivado pela visualização da sua publicidade ou opinião de familiares ou amigos, e não pela sua adequação à condição em causa. Nestas situações, alguns utentes questionam o nosso saber sobre o medicamento, devido à fase de aprendizagem em que nos encontramos.

Do mesmo modo, foram inúmeros os atendimentos em que me era solicitado algum MSRSM sem a apresentação de receita médica válida. Nestas situações, era claro o desconhecimento do conceito de “medicamento sujeito a receita médica”, uma vez que muitos utentes alegavam que, como o medicamento não era compartilhado, também não era sujeito a receita médica. Quando tentava explicar a situação, a maioria dos utentes não aceitava a informação que estava a ser passada, alguns deles acabando por expressar a sua frustração, o que criava um ambiente constrangedor na farmácia.

4. Casos Clínicos

Tal como referido anteriormente, o estágio curricular permite a consolidação de conhecimentos e a sua aplicação em situações reais, inerentes à rotina diária do farmacêutico. Como tal, apresento a seguir alguns casos que surgiram durante os atendimentos que realizei, nos quais refiro o problema exposto e respetiva resolução farmacêutica.

Caso Clínico I

Utente do sexo masculino dirige-se à farmácia para adquirir Amoxicilina 3000 mg, pó para suspensão oral, conforme indicação do médico dentista, mas não apresenta receita médica. Expliquei ao utente que apenas posso ceder MSRSM mediante apresentação de receita médica válida, ao que refere que o médico não teve oportunidade de passar a receita. Em

conversa com o senhor, o mesmo indica que irá realizar cirurgia no dia seguinte às 10h, e que o médico indicou a toma do antibiótico 2h antes da cirurgia.

Perante a situação exposta, contactei, com a supervisão do farmacêutico presente, o médico dentista, o qual confirmou a situação, indicando o número da sua carteira profissional e a dosagem e posologia do medicamento (Amoxicilina 3000 mg, pó para suspensão oral). Realizei uma venda suspensa do antibiótico, indicando a posologia e modo de administração e referindo que, assim que possível, o utente teria de trazer a receita médica para regularizar a venda suspensa. No dia seguinte, o mesmo utente dirige-se à FS para regularizar a venda suspensa e adquirir a segunda embalagem de antibiótico.

Caso Clínico 2

Um senhor chega à FS com uma receita eletrónica, da qual pretendia adquirir, entre outros medicamentos, Quetiapina 100 mg. Após conversa com o utente, este referiu ter vindo de uma consulta do Hospital de Sobral Cid, onde lhe foi passada a receita da sua medicação habitual, pelo médico que o seguia.

Aquando da consulta do histórico do utente, verifiquei que o utente nunca adquiriu outra dosagem que não a de 25 mg, ao que questionei se o médico tinha comunicado a alteração da dosagem. Perante desconhecimento do utente e uma vez que este referiu ainda ter medicação em casa para 5 dias, sugeri que contactasse o médico para averiguar se a alteração da dosagem foi intencional. Mais tarde, o utente regressou à farmácia com a situação devidamente corrigida.

Caso Clínico 3

Uma senhora solicita Imodium Rapid® para tratar a diarreia que surgiu no dia anterior à noite. Após negar febre, questionei se tinha ingerido algo diferente, ao que respondeu ter comido marisco ao jantar do dia anterior, sendo o que o marido apresenta os mesmos sintomas. Informei que nesta situação a loperamida não é aconselhável, pois impede a expulsão do fator causador da diarreia. Assim sendo, aconselhei os probióticos Lacteol® para ambos, indicando a posologia a realizar e salientei a importância de ingerir bastante água, assim como evitar laticínios e alimentos ricos em fibras e gorduras. Alertei, ainda que caso surja febre, a utente deve dirigir-se às urgências.

5. Conclusão

Terminada a etapa final do MICF, concluo que o estágio curricular foi uma experiência preponderante na minha formação, tanto a nível profissional como pessoal. Noto que o estágio foi fundamental para a consolidação dos conhecimentos científicos adquiridos ao longo de 5 anos no MICF, enquanto possibilita a exploração de vertentes de cariz humanístico, tais como a postura e a adaptação do discurso perante o utente que temos perante nós.

Ao longo do estágio, tive oportunidade de desempenhar todas as funções do farmacêutico, permitindo-me, assim, compreender o dinamismo da profissão e a importância que o farmacêutico comunitário assume perante a população em geral. De facto, ser farmacêutico é uma profissão desafiante, pois implica uma constante atualização de conhecimentos e a procura pela melhor forma possível de transmitir os conhecimentos aos utentes. Todavia, torna-se também uma área bastante gratificante, uma vez que o farmacêutico constitui, simultaneamente, a primeira e última linha de contacto com o utente, sendo possível ajudar o próximo através da aplicação dos nossos conhecimentos.

Por conseguinte, faço um balanço positivo do estágio, tal como evidenciado na análise SWOT, uma vez que permitiu desenvolver um maior grau de autonomia, responsabilidade e confiança no desempenho das tarefas diárias, assim como no aconselhamento ao utente. Não obstante, tenho ainda um longo caminho a percorrer no sentido de me tornar uma profissional de saúde de excelência, mas considero que adquiri as ferramentas essenciais para dar início a esta nova jornada que é a profissão farmacêutica.

6. Referências Bibliográficas

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **A Farmácia Comunitária** [Acedido a 10 de julho de 2020]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>
2. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **Boas Práticas Farmacêuticas para a farmácia comunitária (BPF)**. Conselho Nacional da Qualidade. 3ª edição. 2009. 1-53.
3. NORMA GERAL Nº 30-NGE-00-010-02. 2018 – **Preparação Individualizada da Medicação (PIM)**. Lisboa: Ordem dos Farmacêuticos.
4. INFARMED – **Medicamentos Manipulados** [Acedido a 13 de agosto de 2020]. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/inspecao-medicamentos/medicamentos-manipulados>
5. WORLD HEALTH ORGANIZATION – **Track 2: Health literacy and health behaviour**. Genebra: WHO, s. d. [Acedido a 14 de agosto de 2020]. Disponível em: <https://www.who.int/healthpromotion/conferences/7gchp/track2/en/?fbclid=IwAR0vG-G-w6gVdeI1xfO26jUhoPsqVAzTdnc-2FPXojNjmczjQhhcTlav6aY>

7. Anexos

Anexo I – Dispensadores de PIM



Figura 1 – Dispensador de PIM. Na parte da frente do dispensador, consta o nome do utente, a identificação da farmácia e respetivo contacto, a data da preparação do dispensador e a semana a que se destina o seu uso.



Figura 2 – Interior do dispensador de PIM. Os medicamentos são dispostos consoante a altura do dia em que devem ser tomados, ao longo da semana. Consta sempre uma tabela resumo, identificando o nome do medicamento no dispensador e a quantidade.

Anexo 2 – Formações realizadas durante o estágio curricular

Tema	Entidade Responsável	Data
Apresentação da gama existente e de novos produtos	Caudalie	26 de maio
Anthelios	Cosmética Ativa	3 de junho
Caladryl Dermatite Atópica & Caldryl Derma Solares	Perrigo	4 de junho
Articulações Saudáveis	Pharma Nord	16 de junho
FreeStyle Libre	FreeStyle Libre	19 de junho
SFVETI	Farmácia Saúde	22 de junho
Proteção Solar	ISDIN	22 de junho
O avanço na terapêutica do doente com Dermatite Atópica moderada a grave – Do desenvolvimento à prática clínica	Escola Pós-graduação em Saúde e Gestão	25 de junho
Gama Patta e produtos de veterinária	Espaço Animal	26 de junho
Paranix Extra Forte, Arterin Colesterol, Dafalgan/Efferalgan	Perrigo	30 de junho
Prescrição no Exercício Físico e Nutrição no Combate ao Sedentarismo. O que mudou?	Bene	1 de julho
Estratégias de Marketing Digital com sucesso na Farmácia	Escola Pós-graduação em Saúde e Gestão	8 de julho
MentalAction & Viterra	Perrigo	9 de julho
Caladryl Derma & Bio-oil	Perrigo	14 de julho
Arnigel	Boiron	16 de julho
Desparasitação Externa nos Animais de Companhia	KRKA	22 de julho
A utilização dos óleos essenciais – Gamas Purificante/SOS Insetos/Anti-Piolhos	Puressentiel	23 de julho
Paranix & Jungle Formula	Perrigo	28 de julho
Flabien – Diosmina Micronizada: da Farmacopeia Europeia ao aconselhamento	KRKA	28 de julho

PARTE III

Edição de Bases: o futuro da edição de genes?

Sob orientação do Professor Doutor Luís Almeida

Resumo

A edição de genes, com recurso ao sistema CRISPR-Cas9, é capaz de corrigir uma mutação num gene, através da substituição da porção mutada por uma sequência de DNA exógeno. No entanto, o primeiro passo para esta correção é o corte da dupla cadeia de DNA. Este fenómeno está associado a uma elevada prevalência de produtos indesejados, uma vez que estes, devido aos processos de reparação celular do DNA, vão conter pequenas inserções e deleções, denominadas de *indels*. Por outro lado, a maioria das doenças genéticas humanas são causadas por mutações pontuais num único nucleótido. Consequentemente, emergiu o interesse pelo desenvolvimento de uma técnica que apenas alterasse o alelo mutante e à qual não estivessem associadas elevadas taxas de *indels*.

Surgiu, então, a edição de bases. Esta técnica é capaz de converter, de forma programada, um nucleótido noutro, sem a necessidade de cortar a dupla cadeia de DNA. Recorrendo ao sistema CRISPR, associado a variantes da Cas9 cataliticamente desativadas e a desaminases, foram desenvolvidos dois tipos de editores de bases – editores de bases citosina e editores de bases adenina – que, em conjunto, permitem realizar as seguintes transições: C→T, G→A, T→C e A→G. Atualmente, existem diversas versões de ambos os editores, resultado de sucessivas otimizações com o intuito de melhorar a eficácia e a pureza do produto obtido. Do mesmo modo, as estratégias de entrega às células têm de ser adaptadas, uma vez que o tamanho dos editores de bases é superior à capacidade de carga dos vetores convencionais. Uma das estratégias passa por dividir o editor e entregá-lo à célula em dois vetores AAV distintos, sendo posteriormente reconstituído dentro da célula alvo. No entanto, outros métodos também têm sido utilizados, tais como os vetores não virais, através de eletroporação ou transporte mediado por lípidos.

Apesar de esta técnica acarretar, ainda, muitos obstáculos que têm de ser ultrapassados, a edição de bases é uma técnica bastante versátil, que tem sido utilizada no estudo de diversas patologias genéticas e seu potencial tratamento. Tal, pode ser conseguido através da introdução de codões STOP, de mutações no codão de iniciação ou da correção de mutações *nonsense*, entre outros. Consequentemente, perante os resultados obtidos, pode afirmar-se que estamos a caminho do domínio de uma tecnologia revolucionária, que se espera que venha a permitir manipular o genoma com grande precisão e, assim, tratar ou curar múltiplas doenças.

Palavras-chave: Editor de bases, CRISPR, Cas9 desativada, desaminase da citidina, adenina desaminase, entrega à célula.

Abstract

By taking advantage of the CRISPR-Cas9 system, gene editing is able to correct a gene mutation through replacement of the mutated portion with an exogenous DNA. However, the first step for this correction is to generate double-stranded DNA breaks. This process is associated with a high prevalence of unwanted products, because cellular DNA repair will introduce in high rates small insertions or deletions, called indels. On the other hand, most human genetic diseases are caused by point mutations in a single nucleotide. Therefore, the interest in developing a technique that only changes the mutant allele and that is not associated with a high rate of indels arised.

Thus, base editing was developed. This technique is able to convert, in a programmable manner, one base into another, without the need to introduce the double-stranded DNA breaks. Using the CRISPR system, associated with catalytically deactivated Cas9 variants and deaminases, two types of base editors were created – cytosine base editors and adenine base editors – which, together, can perform the following transitions: C→T, G→A, T→C and A→G. Currently, there are several versions of both editors as a result of successive optimizations in order to improve the efficiency and the final product purity. Likewise, the delivery strategies to the cells needs to be tailored, once the size of the base editors is larger than the load capacity of most known vectors. One of the strategies is to split the base editor and deliver each half to the cell into two different AAV vectors, where the full-length base editor is then reconstituted within the target cell. Nevertheless, other methods have also been used, such as non-viral vectors, through electroporation or transport through lipids.

Despite the many hurdles that are yet to be overcome, base editing is a very versatile technique, which has been used in both study of several genetic pathologies and potential treatments. This can be achieved through the introduction of STOP codons, changes in the initiation codon or correction of nonsense mutations, among others. Therefore, the results indicate that we are in the right path towards future successful application of gene editing.

Keywords: Base editor, CRISPR, deactivated Cas9, cytidine deaminase, adenine deaminase, delivery to the cell.

Lista de Abreviaturas

A – Adenina

AAV – *Adeno-associated virus*

ABE – Editores de Bases Adenina

APOBEC – *Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like*

BE – Editores de Bases

BER – Reparação por Excisão de Bases

bp – Pares de bases

C – Citosina

Cas9 – *CRISPR associated protein 9*

CBE – Editores de Bases Citosina

CRISPR – *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

dCas9 – *CRISPR associated protein 9* desativada

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DSB – Quebra simultânea de ambas as cadeias de DNA

G – Guanina

HDR – *Homology-directed repair*

HR – Recombinação Homóloga

ITR – sequência de repetição terminal invertida

nCas9 – *CRISPR associated protein 9 nickase*

NHEJ – *Non-homologous end-joining*

PAM – *Protospacer Adjacent Motif*

RNA – Ácido ribonucleico

RNP – Ribonucleoproteínas

sgRNA – *Single-guided RNA*

SNP – *Single-Nucleotide Polymorphism*

ssDNA – *Single-standed DNA*

T – Timina

U – Uracilo

UGI – Inibidor do uracil *N-glycosylase*

UNG – *Uracil N-glycosylase*

I. Introdução

A capacidade de editar eficientemente sequências de DNA, no genoma de células vivas, tem sido um objetivo central nas ciências da vida. A aplicação do sistema CRISPR-Cas9 (do inglês: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated protein 9*) revolucionou o campo da engenharia genética, uma vez que, numa grande variedade de células e organismos, permitiu cortar a dupla cadeia de DNA (DSB; do inglês: *Double-strand DNA break*), num local específico do genoma (Hess *et al.*, 2017; Rees e Liu, 2018).

No entanto, a eficácia desta técnica – edição de genes – é baixa, gerando uma grande proporção de produtos indesejados. Aliado ao facto de que, para a maioria das doenças genéticas conhecidas, é necessária a correção de uma mutação pontual no gene de interesse em vez de uma alteração substancial do gene, surgiu a necessidade de desenvolver uma técnica que não exigisse esta quebra na dupla cadeia de DNA (Komor *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2019).

Neste sentido, foi desenvolvida uma nova abordagem a esta técnica, denominada de edição de bases. Esta recente tecnologia tira partido de componentes do sistema CRISPR, associado a variantes da Cas9 (do inglês: *CRISPR associated protein 9*) e a uma desaminase (Hess *et al.*, 2017; Rees e Liu, 2018). Deste modo, deixou de ser necessário recorrer a DSB, assim como fornecer um DNA molde à célula (Kim, Komor *et al.*, 2017; Lee, Park *et al.*, 2019). Tal como esperado, a eficácia do processo foi aumentada, uma vez que a quantidade de produtos indesejados obtidos é significativamente menor (Wu *et al.*, 2019).

Recorrendo à edição de bases, é possível substituir uma base ou um par de bases por outro diferente, de forma programada, permitindo estabelecer mutações pontuais em células que não se dividem (Kim, Komor *et al.*, 2017; Rees e Liu, 2018). Esta técnica pode, então, representar a melhor ou, em alguns casos, a única estratégia para tratar este tipo de patologias que têm na sua génese mutações pontuais (Liang *et al.*, 2017).

Assim, a edição de bases tem vindo a ser utilizada para diversas finalidades e em vários sistemas (Koblan *et al.*, 2018). Porém, há ainda alguns obstáculos que dificultam a aplicação ideal deste sistema (Lee e Kim, 2019), tais como a entrega às células (Kim, Komor *et al.*, 2017) e efeitos *off-target* (Zuo *et al.*, 2019). Estes assuntos têm vindo a ser abordados por diversos autores, tendo sido possível encontrar estratégias para ultrapassar estes obstáculos, que serão referidas ao longo desta monografia.

2. Da edição de genes à edição de bases

2.1 Edição de genes: breves considerações e inconvenientes

A edição de genes permite a introdução de DNA exógeno num local específico do genoma, de modo a substituir a porção que se encontra mutada (Hilton e Gersbach, 2015). Na maioria das situações em que se pode aplicar a edição de genes utilizando o sistema CRISPR-Cas9, são utilizados RNAs guia (sgRNAs; do inglês: *Single-guided RNA*) para conduzir a nucleasa Cas9 a um local específico do genoma, onde vai inserir uma DSB (Figura 1) – passo inicial para a correção de genes (Hess *et al.*, 2017; Hilton e Gersbach, 2015; Kim, Komor *et al.*, 2017; Salsman e Dellaire, 2017; Wu *et al.*, 2019).

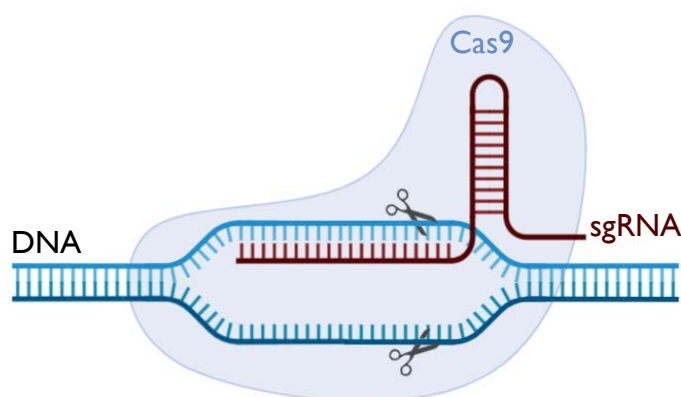


Figura 1 – Estrutura e mecanismo de ação do sistema CRISPR-Cas9. O sgRNA reconhece e hibridiza com um local específico do DNA, para o qual vai guiar a Cas9, onde esta vai cortar ambas as cadeias de DNA (representado pelas tesouras), dando origem a uma DSB.

Os mecanismos celulares de reparação do DNA reconhecem o corte e reparam-no, preferencialmente, por mecanismos de NHEJ (do inglês: *Non-homologous end-joining*) (Hilton e Gersbach, 2015; Kim, Komor *et al.*, 2017; Salsman e Dellaire, 2017). Este processo de reparação pode levar a alterações da sequência genética, através da introdução de inserções, deleções, translocações ou outro tipo de rearranjos no local do corte. Consequentemente, a maioria dos produtos que resultam deste processo vão conter pequenas inserções ou deleções, denominadas de *indels* (Hilton e Gersbach, 2015; Rees e Liu, 2018).

Na presença de um molde de DNA, homólogo às sequências delimitadas pela DSB, esta porção do genoma pode ser reparada por reparação homóloga HDR (do inglês: *Homology-directed repair*), processo que vai competir com a reparação por NHEJ, durante a resolução das DSB (Hilton e Gersbach, 2015). Contudo, em organismos eucarióticos superiores, a HDR é ineficaz devido à baixa taxa de recombinação homóloga e a dificuldades em entregar o DNA molde à célula. Deste modo, obtêm-se mais frequentemente *indels* do que substituição de genes (Komor *et al.*, 2016; Molla e Yang, 2019). Por conseguinte, a identificação do corte da dupla cadeia como principal problema da edição de genes, conduziu à ideia que era necessário desenvolver um método que dispensasse o corte da dupla cadeia de DNA (Wu *et al.*, 2019).

2.2 Edição de bases: uma nova abordagem à edição de genes

A maioria das mutações patogênicas conhecidas do ser humano pertencem ao grupo das mutações pontuais, denominadas de SNP (do inglês: *Single-Nucleotide Polymorphism*) (Rees e Liu, 2018). Tendo isto em conta, e considerando a baixa eficácia da edição de genes, surgiu o interesse de corrigir apenas estas bases mutantes, sem alterar o restante genoma e sem gerar efeitos *off-target*, de modo a ser possível tratar e estudar doenças genéticas (Lee, Park et al., 2019; Rees e Liu, 2018; Wu et al., 2019).

Surgiu, então, a edição de bases. Esta técnica permite substituir, de forma programada, um par de bases alvo por outro, sem a necessidade de introduzir DSBs, de fornecer à célula um molde ou depender dos mecanismos de reparação celulares (Kim, Komor et al., 2017; Rees e Liu, 2018). Deste modo, é possível aumentar a eficiência do método, diminuindo a ocorrência de *indels* (Komor et al., 2016).

A edição de bases permite executar todas as transições possíveis: C→T, T→C, G→A e A→G. Para tal, são utilizados editores de bases (BE; do inglês: *base editor*) (Figura 2) do sistema CRISPR/Cas, Cas9 desativada (dCas9; do inglês: *deactivated Cas9* ou *dead Cas9*) e uma desaminase (Molla e Yang, 2019).

2.2.1 Desativação da Cas9

Como referido anteriormente, a edição de bases surgiu com o intuito de excluir a necessidade cortar a cadeia dupla de DNA, que se verificava na edição de genes. Sendo a Cas9 responsável por esta DSB (Hess et al., 2017), contornou-se este problema através da desativação catalítica desta nuclease (Komor et al., 2016).

Assim, foram adicionadas mutações à Cas9, dando origem à dCas9. Desta forma, a atividade catalítica da Cas9 é inativada, mas a sua capacidade de se ligar ao DNA continua intacta. Consequentemente, a dCas9 não consegue hidrolisar a ligação fosfodiéster do DNA, não ocorrendo DSBs (Komor et al., 2016; Wu et al., 2019).

O direcionamento específico da dCas9 depende da complementaridade entre o sgRNA e a sequência de DNA alvo (Shvets e Kolomeisky, 2017). Após reconhecimento da PAM (pequena sequência de nucleótidos no DNA alvo adjacente à sequência especificada pelo sgRNA; do inglês: *Protospacer Adjacent Motif*), a dCas9 promove a desnaturação progressiva do DNA alvo e inicia o emparelhamento de bases entre a cadeia de DNA alvo e o sgRNA (Sternberg et al., 2014). Deste modo, forma-se um R-loop (Figura 2), com cerca de 20

nucleótidos de comprimento, que consiste num híbrido de RNA:DNA entre a cadeia alvo do DNA e o sgRNA ligado à dCas9 (Laughery *et al.*, 2019). É, então, neste R-loop que se encontra o nucleótido alvo a ser alterado pela desaminase (Komor *et al.*, 2016).

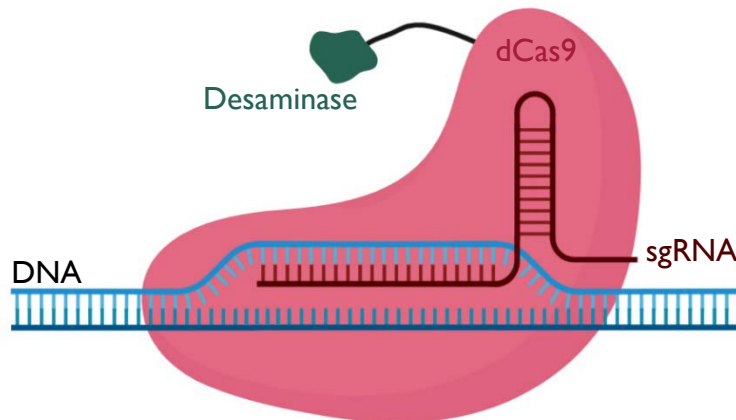


Figura 2 – Estrutura e mecanismo de ação do BE. A dCas9 está ligada na porção N-terminal a uma desaminase e vai-se associar a uma sgRNA. Após reconhecimento da PAM, a dCas9 liga-se ao DNA, orientada pela sgRNA, formando um R-loop que envolve apenas uma cadeia de DNA. (Adaptado de Hess *et al.*, 2017)

2.2.2 Editores de bases e sua otimização

Os editores de bases são proteínas quiméricas (Eid *et al.*, 2018) que, normalmente, não criam DSBs, pelo que a formação de *indels* e a ocorrência de efeitos *off-target* são minimizadas (Eid *et al.*, 2018; Molla e Yang, 2019; Rees e Liu, 2018). Este sistema tira partido da atividade de uma desaminase, em conjunto com o direcionamento preciso da dCas9 (através de um sgRNA (Eid *et al.*, 2018)), sendo uma estratégia robusta para converter um par de bases noutro diferente (Hess *et al.*, 2017; Levy *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2019).

Estão descritas 2 classes de editores de bases (BE) diferentes: os editores da base citosina (CBE), que convertem o par C-G no par T-A, e os editores da base adenina (ABE), que convertem o par A-T no par G-C (Levy *et al.*, 2020; Molla e Yang, 2019; Rees e Liu, 2018). Conjuntamente, os CBEs e os ABEs conseguem realizar as 4 transições possíveis: C → T, T → C, G → A e A → G (Rees e Liu, 2018). A escolha do BE a usar vai depender do alvo, da disponibilidade da PAM e do modo como o BE é entregue à célula (Eid *et al.*, 2018).

2.2.2.1 Editores da Base Citosina

A primeira geração de BEs é denominada de Editores da Base Citidina, realizando a conversão do par C-G no par T-A. Para tal, tira partido da atividade de desaminases da citidina (Rees e Liu, 2018; Wu *et al.*, 2019). As desaminases são essenciais a diversos processos no corpo humano, tais como, no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central e nas vias de imunidade inata e adaptativa. Particularmente, a família das APOBEC (do inglês: *Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like*) são responsáveis pela restrição das infecções virais, através da edição de bases do genoma viral (Eid *et al.*, 2018; Hess *et al.*, 2017). A primeira enzima a ser identificada foi a APOBEC1 (do inglês: *Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like*) (Wu *et al.*, 2019), tendo sido a que demonstrou maior atividade de desaminação em DNA de cadeia simples (ssDNA; do inglês: *Single-stranded DNA*) (Komor *et al.*, 2016). Através da fusão desta desaminase com a dCas9, proveniente do *Streptococcus pyogenes*, criou-se o BEI (Rees e Liu, 2018; Wu *et al.*, 2019).

As desaminases da citidina catalisam a desaminação da citosina (C), dando origem a uracilo (U), que, por sua vez, possui as propriedades de emparelhamento com a timina (T) (Komor *et al.*, 2016). A maioria das desaminases da citidina conhecidas atuam no RNA, que não precisa de ser submetido a processamento adicional. No entanto, algumas desaminases da citidina são capazes de atuar no DNA, mas apenas no ssDNA (Rees e Liu, 2018).

No caso do ssDNA, o R-loop formado pela dCas9 permite que a desaminase da citidina faça a conversão de C a U (Figura 3), fenómeno que ocorre de forma programada (Komor *et al.*, 2016). A posterior reparação do R-loop dá-se segundo vários processos: (1) por substituição de U por T, durante a replicação do DNA, ou (2) por reparação por excisão de bases (BER; do inglês: *Base Excision Repair*) (Hess *et al.*, 2017; Komor *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2019). Este último processo é iniciado pela UNG (do inglês: *Uracil N-glycosylase*), que, reconhecendo a incompatibilidade do par U-G no genoma, corta a ligação glicosídica entre o uracilo e a desoxirribose (Rees e Liu, 2018).

Deste modo, recorrendo ao BEI, é possível obter a desaminação de uma citosina de forma localizada e eficiente *in vitro*, restrito a uma janela de atividade de cerca de 12 a 16 pares de bases (bp; do inglês: *base pair*) a partir da PAM do sgRNA (Eid *et al.*, 2018; Hess *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019).

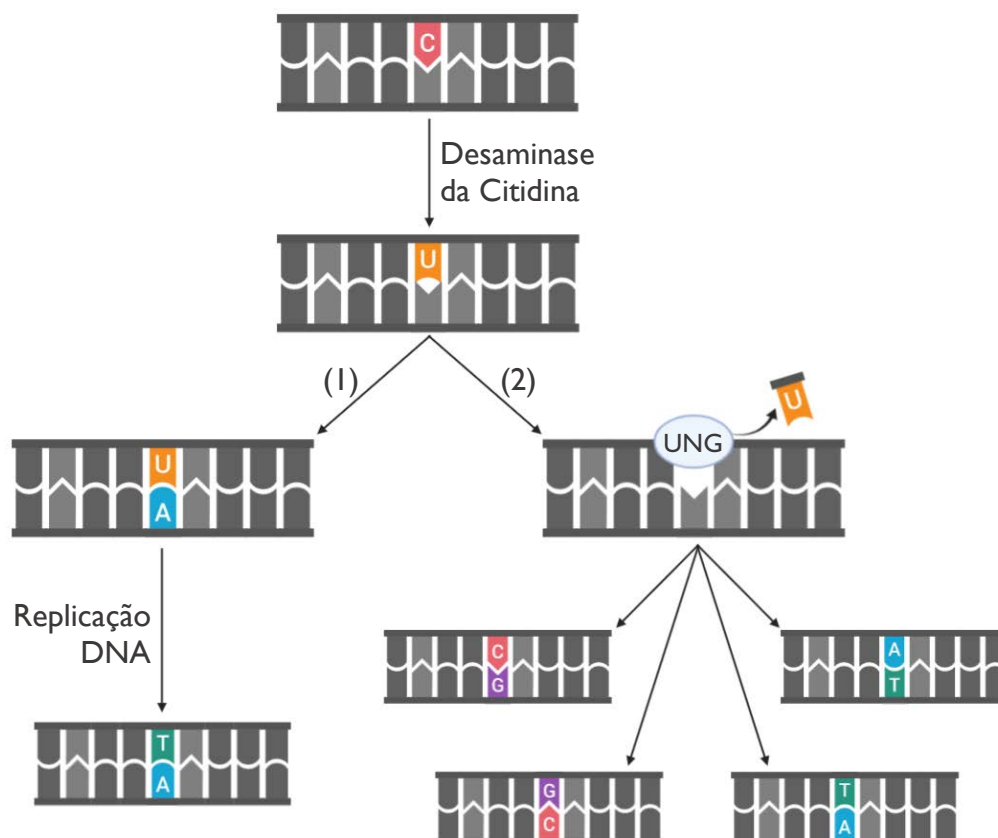


Figura 3 – Conversão do par de bases C-G pela desaminase da citidina. Após formação do R-loop pela dCas9, a desaminação da C, realizada pela desaminase da citidina, dá origem a um U. A posterior reparação da incompatibilidade U-G dá-se por duas vias diferentes: (1) o U é substituído por uma T durante a replicação do DNA, ou (2) há reparação por BER. Neste segundo processo, o UNG corta a ligação glicosídica entre o U e a desoxirribose, levando à excisão do U. Posteriormente, pode ser inserido qualquer nucleótido, dando origem aos pares T-A, A-T, G-C ou, novamente, ao par C-G. (Adaptado de Hess *et al.*, 2017)

Embora o BEI seja geralmente eficaz *in vitro*, não o é em células humanas. Este facto deve-se à reparação celular do intermediário U-G que se forma no DNA, por processos de BER. Tal como referido anteriormente, este par de bases é reconhecido como um erro pela célula, sendo removido pela UNG (Molla e Yang, 2019) que, ao reconhecer a incompatibilidade U-G, cliva a ligação glicosídica entre o uracilo e a desoxirribose (Rees e Liu, 2018), resultando na introdução de um nucleótido aleatório (Figura 3) (Molla e Yang, 2019).

Para ultrapassar este obstáculo, foi adicionado, ao BEI, um inibidor da UNG (UGI), dando origem a uma segunda geração de BEs, o BE2 (Hess *et al.*, 2017; Rees e Liu, 2018; Wu *et al.*, 2019). O UGI liga-se diretamente ao UNG, inibindo-o (Rees e Liu, 2018). Com esta otimização, foi possível aumentar a eficiência do BE, uma vez que a BER é desfavorecida (Figura 4) (Eid *et al.*, 2018; Hess *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019).

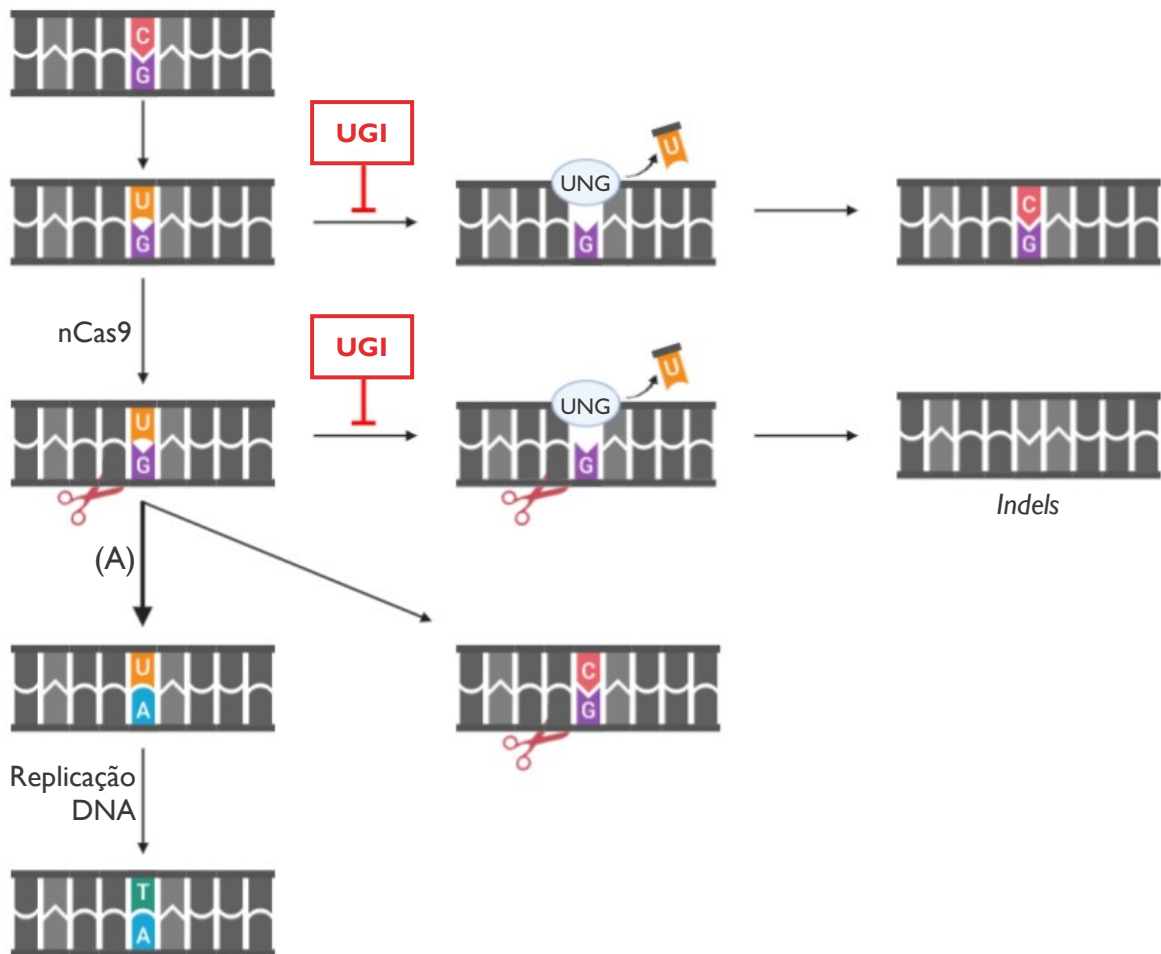


Figura 4 – Otimização da edição de bases. Após conversão do par C-G no par U-G, a via da UNG é inibida, uma vez que o UGI está presente nos BE2, BE3, e BE4. O BE3 e o BE4 estão dotados da nCas9 (em vez da dCas9), pelo que se observa um corte na cadeia de DNA não editada (representada por uma tesoura). Consequentemente, a célula é induzida a reparar o par U-G, o que favorece a obtenção do par U-A, em detrimento do par inicial C-G. Por fim, através da replicação do DNA, obtém-se o par T-A. (Adaptado de Rees e Liu, 2018)

A eficiência da edição de bases com o BE2 é limitada, uma vez que apenas é possível editar uma das cadeias de DNA. Para substituir diretamente a guanina (G), que se encontra na cadeia não desaminada, foi criado um terceiro editor – BE3 – que corta especificamente a cadeia de DNA não editada, recorrendo à nCas9 (do inglês: *CRISPR associated protein 9 nickase*) (Hess *et al.*, 2017; Rees e Liu, 2018; Wu *et al.*, 2019). Esta variante parcialmente inativada da Cas9 é capaz de cortar uma cadeia simples de DNA, mas não a cadeia dupla, pelo que não há risco de formar DSBs. Deste modo, a nCas9 vai clivar a cadeia de DNA inalterada. Por conseguinte, consegue-se induzir a célula a reparar o par U-G, o que favorece a obtenção do par U-A (representado na Figura 4 pelo processo A) (Komor *et al.*, 2017). A cadeia não cortada vai, então, servir de molde (Rees e Liu, 2018) e o par U-A é posteriormente

convertido no par T-A durante a replicação do DNA (Hess *et al.*, 2017; Rees e Liu, 2018). Assim, consegue-se aumentar eficiência da edição de bases em células de mamíferos (Rees e Liu, 2018).

Apesar de a introdução da nCas9 se traduzir numa maior pureza dos produtos obtidos, a formação de *indels* ainda continua presente (Komor *et al.*, 2017; Li, Wang *et al.*, 2018). Tal pode ser devido a uma enzima de BER, denominada de DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase ou AP lyase, que cliva cadeias de ssDNA nos locais onde não existem bases (Komor *et al.*, 2017). Visto que a nCas9 corta a cadeia oposta ao U, a clivagem da ligação glicosídica pelo UNG, seguida do processamento pela AP lyase, pode resultar em DSB, o que promove a formação de *indels* (Komor *et al.*, 2017; Wang, Ding *et al.*, 2020). Para solucionar este inconveniente, adicionou-se, aos BEs, uma proteína Gam, proveniente de bacteriófagos Mu (Komor *et al.*, 2017; Rees e Liu, 2018). Esta proteína liga as extremidades livres das DSBs, reduzindo, assim, a formação de *indels* durante a edição de bases (Komor *et al.*, 2017). Por conseguinte, surgiu um novo CBE, o BE4-Gam (Komor *et al.*, 2017; Rees e Liu, 2018).

Para maior otimização da eficácia e pureza dos produtos obtidos, têm sido utilizadas outras variantes da desaminase da citidina, assim como outros tipos de proteínas Cas. A título de exemplo, destaca-se a APOBEC3A (Gehrke *et al.*, 2018; Wang, Ding *et al.*, 2020; Zong *et al.*, 2018), a AID (do inglês: *activation-induced cytidine deaminase*) (Liu *et al.*, 2019) e a Cas12a, também conhecida por Cpf1 (Li, Wang *et al.*, 2018; Wang, Ding *et al.*, 2020), respetivamente.

2.2.2.2 Editores da Base Adenina

A distribuição dos SNPs patogénicos não é uniforme (Rees e Liu, 2018), uma vez que, no genoma humano, a transição C→T representa a maioria das mutações pontuais (Christensen *et al.*, 2019). Tal é concordante com a taxa relativamente alta de desaminações espontâneas da citosina (Christensen *et al.*, 2019; Rees e Liu, 2018). Por conseguinte, se for possível reverter esta mutação, consegue-se corrigir o tipo mais comum de SNPs patogénicos (Rees e Liu, 2018). Contudo, os CBEs não são capazes de corrigir este tipo de SNP (Christensen *et al.*, 2019), pelo que foi necessário desenvolver outro tipo de BEs para solucionar este problema. Assim, surgiram os ABEs (Rees e Liu, 2018).

À semelhança da citosina, a adenina também pode ser desaminada de modo a ser possível alterar as suas propriedades de emparelhamento. Desta desaminação resulta a inosina

(Rees e Liu, 2018), que apresenta propriedades semelhantes à guanina, sendo reconhecida pela polimerase como tal (Eid et al., 2018; Wu et al., 2019).

O desconhecimento de uma desaminase da adenosina capaz de atuar no DNA de cadeia simples constitui o maior obstáculo ao desenvolvimento de ABEs (Eid et al., 2018; Rees e Liu, 2018; Wu et al., 2019). Algumas tentativas de, no BE3, substituir a APOBEC1 por uma desaminase do RNA da adenosina, não demonstraram edição da adenina no DNA (Gaudelli et al., 2017; Rees e Liu, 2018; Wu et al., 2019). Para ultrapassar este problema, desenvolveu-se a TadA, uma desaminase da desoxiadenosina, proveniente da desaminase da adenosina do RNA de transcrição (tRNA) da *Escherichia coli*, capaz de atuar em ssDNA (Eid et al., 2018; Rees e Liu, 2018).

A primeira geração de ABEs foi desenvolvida tirando partido da resistência bacteriana a antibióticos. À *E. coli*, foram adicionadas TadA mutantes e genes defeituosos de resistência ao cloranfenicol. Para sobreviver na presença do antibiótico, a fusão mutante TadA-dCas9 teve de converter, no gene defeituoso de resistência ao cloranfenicol, a desoxiadenosina em desoxininosina (Eid et al., 2018; Gaudelli et al., 2017; Rees e Liu, 2018).

Tal como os CBEs, os ABEs tiram partido da dCas9 associada a um sgRNA para realizar a desaminação de uma porção de DNA de cadeia simples. De entre os diferentes ABEs desenvolvidos, o ABE7.10 é o mais eficiente, convertendo o par A-T no par G-C dentro de uma janela de atividade de 4 a 9 bp a partir do PAM (Eid et al., 2018). No entanto, outros ABEs, nomeadamente o ABE6.3, apresentam uma maior eficiência de edição em posições próximas do PAM (Rees e Liu, 2018), pelo que os limites exatos da janela de atividade variam consoante o alvo (Wu et al., 2019).

2.2.2.3 Comparação dos Editores de Bases

De modo a comparar não só eficiência, mas também as suas construções, encontram-se, de seguida, esquematizadas as arquiteturas de alguns CBEs e ABEs mais relevantes (Tabela I), assim como as respetivas janelas de atividade e PAM (Anexo I).

Comparativamente aos CBEs, os ABEs produzem um produto mais puro, ou seja, geram menos *indels* (Lee et al., 2018; Molla e Yang, 2019; Rees e Liu, 2018). A excisão da inosina é menos eficiente que a remoção do uracilo, o que se deve-se ao facto de ser necessário uma glicosilase, ou outra enzima envolvida na reparação do DNA, para remover a inosina. Assim, é expectável que haja menos cortes na cadeia desaminada e,

consequentemente, menos DSBs, o que, por sua vez, leva a uma menor prevalência de *indels* quando se usam ABEs. Ainda no seguimento deste facto, praticamente não há evidências de conversões de A para outro nucleótido que não G (Molla e Yang, 2019; Rees e Liu, 2018; Wu *et al.*, 2019), o que sustenta a afirmação anterior.

Tabela 1 – Construção de alguns BEs (Adaptado de Rees e Liu, 2018).

	Arquitetura									
BE1	APOBECI	16 aa	dCas9	4 aa						
BE2	APOBECI	16 aa	dCas9	4 aa	UGI					
BE3	APOBECI	16 aa	nCas9	4 aa	UGI					
BE4	APOBECI	32 aa	nCas9	9 aa	UGI	9 aa	UGI			
ABE7.9	TadA	32 aa	TadA mutante	32 aa	nCas9					
ABE7.10	TadA	32 aa	TadA mutante	32 aa	nCas9					
BE4-Gam	Gam	16 aa	APOBECI	32 aa	nCas9	9 aa	UGI	9 aa	UGI	
Cas12a-BE	APOBECI	16 aa	dCas12a	14 aa	UGI					

3. Estratégias para entrega à célula

Um grande obstáculo à edição de genomas *in vivo*, recorrendo ao sistema CRISPR, é a sua entrega à célula através de um veículo eficiente e específico para o alvo (Glass *et al.*, 2018). Isto é transversal a todas as biomoléculas, uma vez que, por mais eficientes que sejam do ponto de vista da sua construção, não vão ser úteis se não forem entregues ao local alvo (Lee e Kim, 2019). No entanto, a entrega eficiente de editores de bases a animais vivos permanece um desafio (Levy *et al.*, 2020).

Seguidamente, são indicadas algumas estratégias para entregar os BEs às células. Uma vez que todas as técnicas utilizadas possuem vantagens e desvantagens (Tabela 2), têm vindo a ser desenvolvidos diferentes métodos, numa tentativa de otimizar esta etapa.

3.1 Vetores Virais

Lentivírus, Adenovírus e Vírus Adeno-associados (AAV; do inglês: *adeno-associated virus*) são alguns dos vetores virais utilizados para a entrega de sistemas CRISPR-Cas9 às células (Huang *et al.*, 2018). Entre estes, os AAVs, vírus pequenos pertencentes à família *Parvoviridae* (Reisinger, 2019), são os vetores virais mais utilizados para a entrega (Glass *et al.*, 2018; Levy *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2019), uma vez que são não patogénicos e são os menos imunogénicos de todos os vetores virais conhecidos até à data (Reisinger, 2019; Xu *et al.*, 2019). Tal deve-se, em parte, ao facto de o DNA transportado permanecer no estado episomal, em vez de ser integrado no genoma do hospedeiro, o que resulta num baixo risco de interferência com outros genes. Obtém-se assim uma expressão persistente do material genético transportado, em células que não se dividem (Broeders *et al.*, 2020; Nidetz *et al.*, 2020; Reisinger, 2019; Xu *et al.*, 2019). Existem diferentes serotipos de AAVs, cada um com diferentes tropismos (Glass *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2019). Deste modo, a entrega à célula de interesse pode ser otimizada através da escolha do serotipo mais adequado (Broeders *et al.*, 2020; Glass *et al.*, 2018; Lee e Kim, 2019).

Contudo, a capacidade de transporte de um AAV é inferior a 5 kb (Chadwick *et al.*, 2017; Levy *et al.*, 2020; Reisinger, 2019), constituindo uma limitação ao transporte genes grandes (Chew *et al.*, 2016; Lim *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2019). Dado que os BEs têm um tamanho de cerca de 5.2 kb, excluindo o sgRNA, não é possível utilizar este vetor viral para os transportar até à célula alvo (Chadwick *et al.*, 2017; Levy *et al.*, 2020; Lim *et al.*, 2020). Para ultrapassar este obstáculo e ser possível recorrer aos AAVs para entregar os BEs às células, foram desenvolvidas técnicas para dividir a sequência do BE em duas metades, cada uma de dimensão inferior à capacidade máxima do vetor (Levy *et al.*, 2020). Consequentemente, passa a ser possível entregar o BE em dois vetores em vez de apenas um (Huang *et al.*, 2018; Lee e Kim, 2019; Levy *et al.*, 2020). Deste modo, consegue-se expandir a capacidade de transporte dos vetores para 9 kb (Xu *et al.*, 2019). Para tal, um dos métodos ao qual se pode recorrer é a reconstituição de *split-inteins* (Levy *et al.*, 2020).

Neste sistema, o BE é dividido em dois fragmentos, cada um deles ligado a um *intein*, posteriormente inseridos em vetores adenovirais distintos. Após co-infecção da mesma célula pelos dois vetores, os *inteins* vão promover a reconstituição do BE, obtendo-se, assim, um transgene único com sequência idêntica ao BE intacto (Levy *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2019).

Vários autores reproduziram esta técnica para entregar tanto CBEs como ABEs às células de tecidos como o fígado, o coração, o músculo, a retina e o cérebro, obtendo

resultados bastante promissores. Verificou-se que a eficiência da edição de bases, nestes tecidos, vai de encontro ou excede os limiares de edição terapeuticamente relevantes para o tratamento de algumas doenças genéticas humanas, em dosagens de AAV reconhecidas como bem toleradas em humanos (Levy *et al.*, 2020; Lim *et al.*, 2020). Os resultados de vários estudos indicaram que a eficiência de edição destes editores divididos (*split-intein*) era comparável com a dos BEs intactos (Levy *et al.*, 2020; Lim *et al.*, 2020; Villiger *et al.*, 2018), significando que, após *splicing*, os *split-intein* são capazes de reconstituir CBEs e ABEs sem gerar perda significativa de eficiência de edição (Levy *et al.*, 2020; Lim *et al.*, 2020). Adicionalmente, não se verifica a indução de *indels* indesejados nem efeitos *off-target* detetáveis (Lim *et al.*, 2020; Ryu *et al.*, 2018), apresentando uma janela de atividade idêntica à do BE original (Lim *et al.*, 2020).

Apesar de todas as vantagens que os vetores virais apresentam, estes também acarretam algumas desvantagens relevantes. Embora os AAV apresentem baixa imunogenicidade, a expressão persistente dos BEs nas células editadas pode gerar uma eventual resposta por parte do sistema imunológico (Broeders *et al.*, 2020; Chew *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2018; Nidetz *et al.*, 2020; Reisinger, 2019), assim como potenciar efeitos *off-target* e instabilidade do genoma (Huang *et al.*, 2018). Outra grande desvantagem dos AAVs é a imunidade pré-existente a estes vetores virais. Uma fração significativa da população possui anticorpos anti-AAV, o que dificulta ou impossibilita este tratamento (Broeders *et al.*, 2020; Nidetz *et al.*, 2020).

3.2 Vetores Não Virais

Tendo em conta as desvantagens referidas, surgiu uma abordagem alternativa que visa ultrapassar estes obstáculos: os vetores não virais (Huang *et al.*, 2018). Embora a entrega à célula mediada por estes vetores seja relativamente ineficiente, têm sido feitos progressos nesse sentido e foram identificadas algumas vantagens (Lee e Kim, 2019). Os vetores não virais apresentam uma capacidade de carga superior e não realizam integração no genoma da célula (Huang *et al.*, 2018). Assim, através destes vetores, é possível manter uma expressão transitória das moléculas entregues, o que previne a ocorrência de efeitos *off-target* e a instabilidade do genoma da célula (Huang *et al.*, 2018; Lee e Kim, 2019; Yeh *et al.*, 2018).

Existem diversos métodos de entrega à célula com base em vetores não virais, sendo alguns destes descritos a seguir. Para tal, a entrega dos BEs é mediada por ribonucleoproteínas (RNP; do inglês: *ribonucleoproteins*), uma vez que, desta forma, a edição *off-target* é reduzida a níveis inferiores aos mensuráveis (Rees *et al.*, 2017).

Eletroporação

Este método consiste em fornecer pulsos elétricos locais que vão aumentar transitoriamente a permeabilidade das membranas celulares (Bordet e Behar-Cohen, 2019; Lee e Kim, 2019), permitindo a entrega do BE sob a forma de RNPs à célula (Kim, Ryu *et al.*, 2017). Apesar de esta técnica poder causar danos celulares, o que limita as suas aplicações terapêuticas (Lee e Kim, 2019), *in vitro* verifica-se uma edição de bases altamente eficiente, sem efeitos *off-target* detetáveis (Kim, Ryu *et al.*, 2017).

Entrega mediada por Lípidos

Este método tira partido do facto de os reagentes lipídicos catiónicos serem capazes de entregar proteínas carregadas negativamente ou complexos proteína-ácido nucleico, tais como os RNPs, a células de mamíferos (Huang *et al.*, 2018; Rees *et al.*, 2017). Consequentemente, através de uma injeção local *in vivo* (Yeh *et al.*, 2018), este tipo de vetor permite entregar à célula o BE complexado com o sgRNA sob a forma de RNP, sendo possível obter melhorias a nível da especificidade, sem aparente redução da edição de bases no alvo (Rees *et al.*, 2017; Yeh *et al.*, 2018). Isto deve-se ao facto de esta estratégia evitar que o genoma da célula sofra uma exposição prolongada ao BE, minimizando, assim, a possibilidade de serem editados locais *off-target* após o local alvo ser modificado (Rees *et al.*, 2017).

No entanto, apesar das suas vastas aplicações, esta técnica tem sido restringida por vários fatores. Entre eles, incluem-se o desenho de um lipossoma com tamanho adequado, uma vez que este fator pode estar relacionado com a eficiência da entrega, a possibilidade de desencadear uma resposta imunológica e a instabilidade dos reagentes lipídicos catiónicos no soro (Lee e Kim, 2019).

Tabela 2 – Vantagens e desvantagens de alguns métodos para entrega de BEs às células

	Vantagens	Desvantagens	Referências
AAV	<ul style="list-style-type: none">• Entrega eficiente in vivo• Tropismo para diferentes tecidos/células• Baixa imunogenicidade• Estado episomal	<ul style="list-style-type: none">• Capacidade de carga reduzida• Pode desencadear resposta imune ou ser inativado por esta• Risco de integração no genoma	Lee e Kim, 2019; Ain <i>et al.</i> , 2015
Eletroporação	<ul style="list-style-type: none">• Entrega eficiente in vitro• Expressão transitória• Simplicidade• Alta reprodutibilidade• Sem limite de carga	<ul style="list-style-type: none">• Pode provocar danos celulares• Geralmente usado in vitro/ex vivo• Geralmente ineficaz in vivo	Lee e Kim, 2019; Ain <i>et al.</i> , 2015; Bordet e Behar-Cohen, 2019
Lípidos	<ul style="list-style-type: none">• Entrega eficiente• Expressão transitória• Grande capacidade carga• Grande eficiência de encapsulação	<ul style="list-style-type: none">• Instável no soro• Pode desencadear resposta imune (problema menor)• Baixa eficácia in vivo	Lee e Kim, 2019; Bordet e Behar-Cohen, 2019; Xiao <i>et al.</i> , 2019

4. Aplicações da edição de bases

Os BEs têm vindo a ser vastamente utilizados em diversos sistemas, tais como procariontes, peixes, mamíferos e embriões humanos (Koblan *et al.*, 2018). A edição de bases demonstrou-se bastante versátil, podendo ser usada de diversos modos, desde o tratamento de doenças genéticas até à criação de modificações genéticas em modelos animais, de modo a permitir o estudo das mesmas (Billon *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017). Deste modo, vários autores têm utilizado a edição de bases na terapia de doenças genéticas, através de diferentes métodos, tais como a criação de codões stop (Huang *et al.*, 2018; Kuscu *et al.*, 2017), reversão destes (Lee, Jo *et al.*, 2019) e alteração do codão de iniciação (Wang, Liu *et al.*, 2020). De seguida, apresentam-se exemplos de algumas patologias cujo tratamento poderá recorrer à edição de bases, assim como esclarecidas algumas destas aplicações.

O código genético é constituído por 64 codões, dos quais 3 são codões stop (TAG, TGA e TAA). Contrariamente aos restantes, os codões stop não possuem um tRNA correspondente, fazendo com que o ribossoma termine a síntese peptídica (Li e Zhang, 2019). Consequentemente, ao introduzir num gene um codão deste tipo, conseguimos suprimir a expressão desse mesmo gene (Kuscu *et al.*, 2017). Surgiu, então, uma técnica denominada de iSTOP (Billon *et al.*, 2017) ou CRISPR-STOP (Kuscu *et al.*, 2017), que, com recurso ao BE3, é capaz de alterar um só nucleótido, de modo a converter codões codificantes de aminoácidos em codões stop (mutação *nonsense*), tal como indicado na Figura 5 (Billon *et al.*, 2017; Kuscu *et al.*, 2017).

Uma grande vantagem da técnica iSTOP é a inexistência do risco de ser afetada por eventuais desaminações de citosina não intencionais, catalisadas pelo BE3, dentro da janela de atividade. Isto deve-se ao facto de esta técnica causar perturbações nos genes em vez de criar/corrigir mutações *missense* (Billon *et al.*, 2017). Consequentemente, esta estratégia demonstrou elevado perfil de segurança e eficiência no silenciamento de genes (Billon *et al.*, 2017; Kuscu *et al.*, 2017). Contudo, a técnica iSTOP apresenta algumas limitações, tais como, a dificuldade de desenhar sgrNAs, uma vez que requer a presença dos codões CAA, CAG, CGA e TGG e, ainda, uma PAM localizada a 13-17 bp de distância do nucleótido alvo. Conjuntamente com o facto de o BE3 não ser eficiente a editar C que possuam um G imediatamente no lado 5', é previsível que a eficiência de edição desta técnica seja limitada a 24% dos locais alvo (Billon *et al.*, 2017).

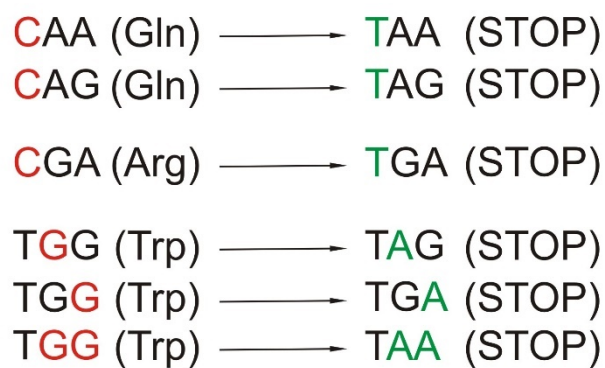


Figura 5 – CRISPR-STOP/iSTOP: Conversão de codões codificantes de aminoácidos em codões stop. Com recurso ao BE3, é possível converter os nucleótidos a vermelho nos nucleótidos a verde. Obtém-se, assim, codões stop quando o alvo é a cadeia codificante (Gln e Arg) ou a não codificante (Trp). (Arg – Arginina; Gln – Glutamina; Trp – Triptofano). (Adaptado de Billon *et al.*, 2017)

Não obstante, o sistema iSTOP apresenta particular interesse, uma vez que pode ser aplicado a toda a parte codificante do genoma, permitindo criar modelos de doenças humanas e estudar as diferentes funções dos genes (Billon *et al.*, 2017; Kuscu *et al.*, 2017), como, por exemplo, as funções de mutações *nonsense* associadas ao cancro (Billon *et al.*, 2017). Esta técnica tem sido utilizada no tratamento de algumas patologias aqui mencionadas, tais como Esclerose Lateral Amiotrófica (Lim *et al.*, 2020), dislipidemia (Chadwick *et al.*, 2017; Chadwick *et al.*, 2018), Tirosinemia Hereditária tipo I (HTI; do inglês: *Hereditary Tyrosinemia type I*) (Rossidis *et al.*, 2018) e infeção pelo vírus da hepatite B (Yang *et al.*, 2020).

Uma nova estratégia, denominada de i-Silence, surgiu também com o objetivo de silenciar genes. No entanto, fá-lo não através da criação de um codão stop, mas sim através da introdução de uma mutação no codão de iniciação (ATG). Deste modo, obtém-se um codão codificante de um aminoácido que não a metionina (Figura 6), suprimindo, assim, a expressão do gene. Consequentemente, esta técnica permite averiguar a função de diferentes isoformas de um gene através da mutação do codão de iniciação dessa isoforma específica. O sistema i-Silence pode ser utilizado para simular 147 das 247 doenças patogénicas humanas causadas por mutações no codão de iniciação. Tirando partido de um ABE, é possível alcançar uma edição segura, precisa e eficiente do codão de iniciação, sem gerar edições não pretendidas (Wang, Liu *et al.*, 2020).

A maior parte dos genes que não podem ser alvo da iSTOP podem, no entanto, ser alvo da i-Silence, pelo que a combinação de ambas as técnicas pode permitir cobrir todo o genoma humano (Wang, Liu *et al.*, 2020).

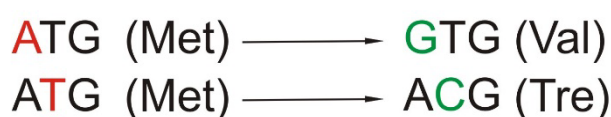


Figura 6 – i-Silence: Conversão do codão de iniciação em codões codificantes de aminoácidos. Com recurso a um ABE, é possível induzir mutações num nucleótido do codão de iniciação, representado a vermelho, obtendo-se um codão que codifica a Val ou a Tre. (Met – Metionina; Tre – Treonina; Val – Valina). (Adaptado de Wang, Liu *et al.*, 2020)

Além destas técnicas, foi desenvolvida outra estratégia para a utilização dos BEs, denominada de CRISPR-Pass, com o objetivo de corrigir as mutações *nonsense* que estão na base de patologias. Como indicado na Figura 7, este método é capaz de converter os codões stop em codões codificantes de aminoácidos, através da alteração de um único nucleótido, com recurso a um ABE. O sistema CRISPR-Pass, aplicável a cerca de 95,5% das mutações *nonsense* clinicamente relevantes (presentes na base de dados ClinVar), foi utilizado no

tratamento da doença Xerodermia Pigmentosa. Obteve-se reconstituição da síntese de proteínas nos fibroblastos derivados destes doentes, o que se traduziu em resistência significativa das células à radiação ultravioleta, durante, pelo menos, 4 semanas. Deste modo, os resultados indicam que a técnica CRISPR-Pass é uma abordagem relevante na terapia de doenças associadas a mutações *nonsense* (Lee, Jo *et al.*, 2019).



Figura 7 – CRISPR-Pass: Conversão do codão stop em codões codificantes de aminoácidos. Com recurso a um ABE, é possível editar um nucleótido do codão stop, representado a vermelho, de modo a obter um codão codificante de aminoácidos. (Arg – Arginina; Gln – Glutamina; Trp – Triptofano). (Adaptado de Lee, Jo *et al.*, 2019)

Outras aplicações dos BEs passam por gerar modelos animais para o estudo de diversas doenças. A título de exemplo, temos a criação de modelos de porco da Síndrome Abléfaró-Macrostomia (AMS; do inglês: *Ablepharon Macrostomia Syndrome*) e do Albinismo Oculocutâneo tipo I (OCA1; do inglês: *Oculocutaneous Albinis type I*), doenças causadas por uma mutação pontual no gene *TWIST2* e *TYR*, respetivamente. Utilizando o BE3, foi possível fazer a conversão C→T (G→A) em culturas de fibroblastos de porco, tanto para uma só cópia do gene como para até 20 cópias do gene. Na AMS, esta conversão caracteriza-se por uma mutação *missense*, uma vez que resulta na transição do ácido glutâmico na lisina (GAC→AAG). Já na OCA1, ocorre uma mutação *nonsense*, visto que o codão que codifica a glutamina é convertido num codão stop (CAG→TAG). Deste modo, obtiveram-se eficácias de edição de 84% do gene *TWIST2* e 12% do gene *TYR*, sem deteção de efeitos *off-target*. Estes resultados sugerem que a edição de bases é um meio seguro e eficaz para obter modelos animais de doenças, uma vez que os fenótipos de AMS e OCA1 foram bem reproduzidos através destes modelos (Li, Duan *et al.*, 2018).

Além das possíveis aplicações da edição de bases supramencionadas, explorou-se também a possibilidade de editar embriões humanos, com o intuito de impedir que uma doença seja transmitida à descendência (Liang *et al.*, 2017). Como exemplos, salienta-se a

correção da β -talassemia (Liang *et al.*, 2017) e do síndrome de Marfan (Zeng *et al.*, 2018). Ambos os autores obtiveram resultados positivos, demonstrando uma edição de bases eficiente e precisa, permitindo a correção das mutações que causam estas doenças (Liang *et al.*, 2017; Zeng *et al.*, 2018).

Dado que existem doenças genéticas associadas a elevada morbidade e mortalidade antes ou pouco após o nascimento, procedeu-se ao seu tratamento *in utero* através da edição de bases. O feto em desenvolvimento possui propriedades que o tornam favorável à edição genética, nomeadamente, a sua imaturidade imunológica. Este fator faz com que não haja resposta imune contra o vetor viral quando este é entregue antes do nascimento, demonstrando, também, a tolerabilidade do feto ao transgene (Rossidis *et al.*, 2018).

Procurou-se, então, editar, *in utero*, o gene *PCSK9* e o gene *Hpd*, com o objetivo de tratar a dislipidemia e a HTI, respetivamente. Entregando o BE3 através de um vetor adenoviral, observou-se uma edição de bases eficiente, que se traduziu em persistência pós-natal ao longo prazo das células editadas, resultando na redução dos níveis plasmáticos de *PCSK9* e de colesterol. De notar que não se verificou edição de bases na progenitora do feto, nem taxas elevadas de *indels*, suportando a ideia que a edição de bases atua de forma eficiente mesmo antes do nascimento. Resultados semelhantes foram obtidos no tratamento da HTI, tendo-se registado uma redução do fenótipo letal da desta doença, devido à introdução de uma mutação *nonsense* que levou à supressão da expressão do gene *Hpd*. Perante estes resultados, pode-se afirmar que a edição de bases é uma potencial abordagem à terapia de um conjunto de doenças congénitas genéticas (Rossidis *et al.*, 2018).

Os exemplos referidos anteriormente demonstram a utilidade da edição de bases para diversas finalidades. Contudo, esta técnica apresenta também potencial para tratar outras doenças, nomeadamente a anemia falciforme (SCD; do inglês: *Sickle Cell Disease*) e a β -talassemia, através da edição de células hematopoiéticas estaminais e progenitoras (HSPCs; do inglês: *hematopoietic stem and progenitor cells*). Assim, através da entrega do BE3 sob a forma de RNP por eletroporação, é possível induzir de forma potente a hemoglobina fetal (HbF) na descendência eritroide, em ambas as patologias. Como resultado desta indução, observou-se uma maior eficiência de enucleação, assim como células eritroides maiores e mais circulares, consistente com uma eritropoiese melhorada. Em suma, estes resultados indicam uma edição de bases altamente eficiente e específica na atenuação da SCD e da β -talassemia, sugerindo potencial tratamento de doenças que podem beneficiar da correção/aumento da hematopoiese (Zeng *et al.*, 2020).

De facto, a edição de bases tem potencial para ser aplicada a diversas situações, nas mais variadas doenças, seja com o intuito de as tratar quer de as estudar. Assim, a Tabela 3 resume algumas aplicações mencionadas neste tópico, referenciando a mutação introduzida pelo BE. Do mesmo modo, o Anexo 2 pretende elucidar, além das patologias em que foram utilizadas a edição de bases, o modo de entrega dos BEs às células e os resultados obtidos pelos respetivos autores.

Tabela 3 – Aplicações dos BEs e respetivas mutações introduzidas

BE usado	Patologia	Gene alvo	Mutação corrigida	Tipo de mutação introduzida	Referências
ABE	Atrofia Muscular Espinhal	SMN2	T→C	Silenciosa	Lin et al., 2020
BE3	β-talassemia	HBB-28	G→A	-----	Liang et al., 2017
BE3	Dislipidemia	ANGPTL3	C→T	Nonsense	Chadwick et al., 2018; Li e Lieber, 2019
BE3	Dislipidemia	PCSK9	C→T	Nonsense	Carreras et al., 2019; Chadwick et al., 2017; Li e Lieber, 2019
ABE 7.10	Distrofia Muscular de Duchenne	Dmd	A→G	Missense	Ryu et al., 2018
BE3	Esclerose Lateral Amiotrófica	SOD1	C→T	Nonsense	Lim et al., 2020
BE3	Deficiência na regeneração celular sensorial no ouvido interno	CTNNB1	C→T	Missense	Yeh et al., 2018
BE3	Fenilcetonúria	PAH	C→T	Missense	Trevisan et al., 2020; Villiger et al., 2018
ABE	Fibrose Cística	CFTR	T→C	Missense	Guerts et al., 2020
BE4 Gam	Infeção crónica pelo Vírus da Hepatite B	cccDNA e gene de superfície e da polimerase	C→T	Nonsense	Yang et al., 2020
CBE	Doença Niemann-Pick tipo C	NPC1	C→T	Missense	Levy et al., 2020
BE3	Síndrome de Marfan	FBN1	G→A	Missense	Zeng et al., 2018
ABE 6.3	HTI	FAH	A→G	Missense	Song et al., 2020
BE3	HTI	Hpd	C→T	Nonsense	Rossidis et al., 2018
ABE	Tumor cerebral	TERT	T→C	-----	Li et al., 2020
ABE max	XPC	XPC	A→G	Reversão da mutação nonsense	Lee, Jo et al., 2019

Legenda: ANGPTL3 – Angiopietina 3 (do inglês: *Angiopoietin-like 3*); cccDNA – DNA circular covalentemente fechado (do inglês: *covalently closed circular DNA*); CFTR – Regulador de condutância transmembranar da Fibrose Cística (do inglês: *Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator*); FAH – Fumarilacetato Hidrolase (do inglês: *Fumarylacetoacetate Hydrolase*); HTI – Tirosinemia Hereditária tipo I (do inglês: *Hereditary Tyrosinemia type I*); PAH – Fenilalanina Hidroxilase (do inglês: *Phenylalanine Hydroxylase*); PCSK9 – Proproteína Convertase subtilisina/cexina tipo 9 (do inglês: *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*); SMN2 – Neurónio Motor de Sobrevivência 2 (do inglês: *Survivor Motor Neuron 2*); SOD1 – Superóxido Dismutase 1 (do inglês: *Superoxide Dismutase 1*); XPC – Xeroderma Pigmentosa, grupo de complementação C (do inglês: *Xeroderma Pigmentosum, complementation group C*).

5. Obstáculos a ultrapassar

A edição de bases demonstrou ser útil, segura e precisa quando aplicada às diversas finalidades acima mencionadas. No entanto, apresenta, ainda, algumas limitações e pontos negativos que se devem ter em consideração na escolha desta técnica. Entre estas, destacam-se a dependência da PAM (Sternberg *et al.*, 2014) e consequente janela de atividade (Eid *et al.*, 2018), os efeitos *off-target* (Zuo *et al.*, 2019), desvantagens relacionadas com o método de entrega à célula (Bordet e Behar-Cohen, 2019; Broeders *et al.*, 2020; Colella *et al.*, 2018), entre outros.

No que diz respeito à PAM, os BEs necessitam de uma sequência NGG adequadamente posicionada, de modo a manter o nucleótido alvo numa janela de atividade estreita, de cerca de 5 bases (Eid *et al.*, 2018; Lv *et al.*, 2020; Schatoff *et al.*, 2019). Deste modo, a disponibilidade de locais alvos é drasticamente restringida (Eid *et al.*, 2018; Molla e Yang, 2019), não cobrindo a maioria dos locais de interesse, nomeadamente vários locais patogénicos (Lu e Huang, 2018). Esta limitação poderá ser ultrapassada com recurso a outras variantes da Cas9, de modo a expandir a janela de atividade dos BEs (Eid *et al.*, 2018; Lu e Huang, 2018).

Outro obstáculo associado à edição de bases é a impossibilidade de realizar transversões de bases (Lu e Huang, 2018; Lv *et al.*, 2020; Niggemann *et al.*, 2020; Schatoff *et al.*, 2019). Apesar de, ao associar CBEs e ABEs, ser possível realizar substituições entre pirimidinas ou purinas (C → T, T → C, G → A e A → G) (Rees e Liu, 2018), é difícil converter pirimidinas em purinas e vice-versa, devido às suas estruturas moleculares distintas (Figura 8). No entanto, é de particular interesse ultrapassar esta limitação, dado que as transversões de bases são responsáveis por uma elevada proporção de doenças, superior às causadas por substituições A → G ou C → T (Lu e Huang, 2018).

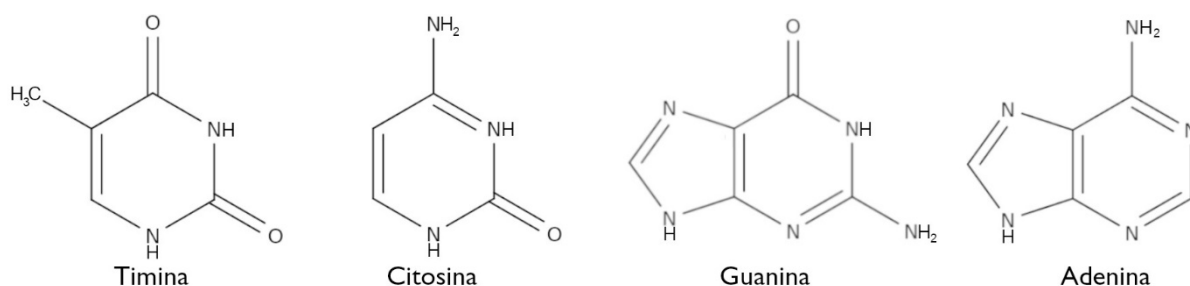


Figura 8 – Estrutura das bases. A Timina e a Citosina assumem as conformações de purinas, enquanto que a Guanina e a Adenina são classificadas como pirimidinas.

O próprio sistema CRISPR-Cas9 também apresenta algumas desvantagens. A maioria das variantes da Cas9 são derivadas da *Streptococcus pyogenes* e da *Staphylococcus aureus* (Moon *et al.*, 2019), bactérias que infetam a população humana em elevadas frequências (Charlesworth *et al.*, 2019). Consequentemente, é de esperar que esta exposição resulte no desenvolvimento de anticorpos anti-Cas9 (Moon *et al.*, 2019; Simhadri *et al.*, 2018). Esta imunidade pré-existente pode reduzir a eficácia da terapia, assim como causar problemas relativos à segurança da mesma (Wagner *et al.*, 2019), visto que há risco de se desenvolver uma resposta imune contra a Cas9 ou contra células que apresentam os epítomos deste antigénio (Simhadri *et al.*, 2018). Tendo sido demonstrada a presença de anticorpos anti-Cas9 em vários estudos (Charlesworth *et al.*, 2019; Simhadri *et al.*, 2018; Wagner *et al.*, 2019), deve-se testar cada doente para a presença ou ausência de imunidade contra a variante da Cas9 a ser utilizada (Charlesworth *et al.*, 2019), bem como monitorizar a resposta imunológica antes e durante o tratamento (Wagner *et al.*, 2019). Para tentar ultrapassar este obstáculo, devem ser investigadas e testadas, em termos de imunogenicidade, proteínas Cas que derivem de organismos com menor prevalência de infeção do Homem (Moon *et al.*, 2019).

Quanto aos efeitos *off-target*, apesar de, em muitas situações, não serem detetáveis ou estarem presentes em níveis baixos (Anexo 2), há evidência da sua ocorrência. Em embriões de murganhos, verificou-se que tanto o BE3 como o ABE7.10 geraram variantes de um nucleótido – SNVs (do inglês: *single-nucleotide variants*), embora neste último em muito menor frequência. As SNVs *off-target* produzidas pelo BE3 são independentes do sgRNA e são, provavelmente, devidas a uma sobre-expressão da APOBEC1. Isto é particularmente relevante dado que foram encontradas SNVs em supressores tumorais e em proto-oncogenes, levantando questões quanto ao risco oncogénico do BE3 (Zuo *et al.*, 2019). Outros estudos verificaram que, tanto os CBEs como os ABEs, são capazes de editar todo o transcriptoma do RNA, podendo-se manifestar em alterações fenotípicas das células, tendo implicações tanto na investigação como na clínica (Grünwald *et al.*, 2019a). Além destas edições não pretendidas, verificou-se que os CBEs e os ABEs são capazes de editar o sgRNA e de se editar a si próprios, o que leva a heterogeneidade nas sequências de codificação dos BEs (Grünwald *et al.*, 2019b).

Algumas soluções podem passar por expressar quantidades mais baixas do BE. Contudo, ao reduzir a quantidade de BE3, estamos igualmente a reduzir a eficiência da edição (Zuo *et al.*, 2019). É possível, também, criar outras variantes dos BEs, nomeadamente através da indução de mutações na desaminase, com o objetivo de diminuir os efeitos *off-target* sem alterar a eficiência e precisão da edição do alvo (Grünwald *et al.*, 2019a, 2019b). Poderá,

ainda, ser benéfico limitar a duração da expressão dos BEs nas células alvo, uma vez que a presença prolongada destes na célula pode ser prejudicial devido ao aumento da possibilidade de ocorrerem efeitos *off-target* (Li e Lieber, 2019).

Por último, as estratégias de entrega às células também apresentam alguns obstáculos que devem ser ultrapassados. As respostas imunes aos vetores virais, nomeadamente aos AAVs, podem neutralizar a terapia, através da indução de células T citotóxicas que eliminam as células que foram alvo do vetor. Ora, sendo os AAVs vírus que ocorrem naturalmente, mais de 40% da população é portadora de anticorpos contra as proteínas da cápside deste vetor. Isto significa que uma porção significativa da população poderá no momento atual não ser elegível para um tratamento com estes vetores (Broeders *et al.*, 2020).

Na tentativa de minimizar os efeitos de uma potencial reação imune, a edição de bases pode ser combinada com terapias imunossupressoras ou ser direcionada para órgãos ditos imunotolerantes, tais como o fígado, ou órgãos com uma relativa independência do sistema imunitário, tais como o olho. Consequentemente, é essencial uma avaliação prévia das abordagens a utilizar, assim como dos potenciais efeitos adversos, de modo assegurar uma utilização segura da edição de bases na clínica (Broeders *et al.*, 2020).

Algumas propriedades biológicas dos AAVs no contexto do hospedeiro humano ainda têm de ser esclarecidas. Destaca-se a imunogenicidade do vetor, a sua potência terapêutica, persistência e a sua potencial genotoxicidade (Colella *et al.*, 2018). A expressão a longo prazo destes vetores, assim como a sua eficácia, continuam questões em aberto. Embora a expressão sustentada do transgene possa ser importante para a terapêutica, a segurança desta expressão prolongada é questionável (Bordet e Behar-Cohen, 2019).

Por último, as terapias que recorrem aos AAVs como modo de entrega às células estão associadas a problemas económicos, dado que o rendimento da produção destes vetores é muito baixo, o que resulta em custos de produção exorbitantes. Por conseguinte, é essencial o desenvolvimento de métodos de produção mais eficientes (Bordet e Behar-Cohen, 2019).

Os exemplos supramencionados revelam a necessidade e urgência em desenvolver BEs mais precisos e com menos efeitos *off-target*, de modo a permitir uma utilização segura dos BEs nos campos da terapia e da investigação (Lv *et al.*, 2020). Do mesmo modo, evidenciam a necessidade de realizar mais estudos de forma a compreender melhor propriedades relevantes dos métodos de entrega às células dos BEs e estratégias para ultrapassar os obstáculos até agora identificados.

6. Conclusão

A edição de genes tem vindo a ser utilizada no genoma eucariota, com o intuito de tratar doenças genéticas. Assim, esta técnica é capaz de substituir a porção do genoma mutada por um segmento de DNA que codifica o fenótipo normal. No entanto, um dos passos fundamentais a esta reparação é o corte da dupla cadeia de DNA. Este fenómeno está associado a uma elevada taxa de inserções e deleções de nucleótidos, devido à baixa precisão dos mecanismos celulares de reparação de cortes que ocorrem simultaneamente nas duas cadeias do DNA. Esta grande desvantagem da edição de genes criou a necessidade de métodos alternativos, de modo a otimizar a terapia de doenças genéticas. Além disso, a maioria das doenças genéticas são causadas por mutações pontuais (SNPs), sendo ideal desenvolver uma técnica que apenas altere o alelo mutante, sem interferir no restante genoma.

Deste modo, tirando partido do sistema CRISPR, de nucleases Cas9 desativadas e desaminases, surgiu uma nova técnica de edição do genoma, a edição de bases. Com recurso a dois tipos de editores de bases, é possível converter de forma programada um nucleótido noutro, permitindo realizar as seguintes transições: C→T e G→A, através dos CBEs, e T→C e A→G, através dos ABEs. Com este sistema foi possível eliminar a dependência de DSBs, obtendo-se um produto mais preciso e puro, ou seja, com menor prevalência de *indels*. Atualmente, existe uma elevada variedade de BEs, visto que a sua estrutura é alvo de constantes otimizações, de modo a obter o melhor resultado possível.

É igualmente importante adaptar os sistemas de entrega à célula existentes aos BEs, uma vez que o sucesso da técnica depende da sua chegada ao alvo. Contudo, o elevado tamanho dos BE obriga a modificações das construções que permitam a utilização dos vetores virais convencionais. Assim, novas estratégias com base tanto em vetores virais como não virais, têm vindo a ser elaboradas, de forma a otimizar esta etapa.

A edição de bases demonstra ser bastante versátil, uma vez que a mesma construção, o BE, pode ser aplicada de diversos modos para atingir diversas finalidades, sejam elas o tratamento ou o estudo da patologia em causa. Consequentemente, esta técnica pode representar a melhor e, muitas vezes, a única opção na terapia de doenças genéticas para as quais não existe, ainda, um tratamento eficaz.

Não obstante, persistem ainda obstáculos que terão de ser ultrapassados para tirar o máximo partido desta técnica. Contudo, a edição de bases demonstra ser superior em termos de precisão e baixo número de *indels*, relativamente aos métodos mais comuns de edição de genes, indicando que estamos no caminho correto do futuro da edição de genes.

7. Referências Bibliográficas

- AIN, Q. U.; CHUNG, J. Y.; KIM, Y. – **Current and future delivery systems for engineered nucleases: ZFN, TALEN and RGEN.** *Journal of Controlled Release.* 205 (2015), 120-127.
- BILLON, P.; BRYANT, E. E.; JOSEPH, S. A.; NAMBIAR, T. S.; HAYWARD, S. B.; ROTHSTEIN, R.; CICCIA, A. – **CRISPR-Mediated Base Editing Enables Efficient Disruption of Eukaryotic Genes through Induction of STOP Codons.** *Molecular Cell.* 67 (2017), 1068-1079.
- BORDET, T.; BEHAR-COHEN, F. – **Ocular gene therapies in clinical practice: viral vectors and nonviral alternatives.** *Drug Discovery Today.* 24 (2019), 1685-1693.
- BROEDERS, M.; HERRERO-HERNANDEZ, P.; ERNST, M. P. T.; PLOEG, A. T.; PIJNAPPEL, W. W. M. P. – **Sharpening The Molecular Scissors: Advances In Gene-Editing Technology.** *IScience.* 23 (2020), 100789.
- CARRERAS, A.; PANE, L. S.; NITSCH, R.; MADEYSKI-BENGTSON, K.; PORRITT, M.; AKCAKAYA, P.; TAHERI-GHAHFAROKHI, A.; ERICSON, E.; BJURSELL, M.; PEREZ-ALCAZAR, M.; SEELIGER, F.; ALTHAGE, M.; KNÖLL, R.; HICKS, R.; MAYR, L. M.; PERKINS, R.; LINDÉN, D.; BORÉN, J.; BOHLOOLY-Y, M.; MARESCA, M. – **In vivo genome and base editing of a human PCSK9 knock-in hypercholesterolemic mouse model.** *BMC Biology.* 17 (2019), 4.
- CHADWICK, A. C.; EVITT, N. H.; LV, W.; MUSUNURU, K. – **Reduced Blood Lipid Levels With In Vivo CRISPR-Cas9 Base Editing of ANGPTL3.** *Circulation.* 137 (2018), 975-977.
- CHADWICK, A. C.; WANG, X.; MUSUNURU, K. – **In Vivo Base Editing of PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9) as a Therapeutic Alternative to Genome Editing.** *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 37 (2017), 1741-1747.
- CHARLESWORTH, C. T.; DESHPANDE, P. S.; DEVER, D. P.; CAMARENA, J.; LEMGART, V. T.; CROMER, M. K.; VAKULSKAS, C. A.; COLLINGWOOD, M. A.; ZHANG, L.; BODE, N. M.; BEHLKE, M. A.; DEJENE, B.; CIENIEWICZ, B.; ROMANO, R.; LESCH, B. J.; GOMEZ-OSPINA, N.; MANTRI, S.; PAVEL-DINU, M.; WEINBERG, K. I.; PORTEUS, M. H. – **Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans.** *Nature Medicine.* 25 (2019), 249-254.

CHEW, W. L.; TABEBORDBAR, M.; CHENG, J. K. W.; MALI, P.; WU, E. Y.; NG, A. H. M.; ZHU, K.; WAGERS, A. J.; CHURCH, G. M. – **A multifunctional AAV–CRISPR–Cas9 and its host response.** *Nature Methods.* 13 (2016), 868-874.

CHRISTENSEN, C. L.; ASHMEAD, R. E.; CHOY, Y. M. – **Cell and Gene Therapies for Mucopolysaccharidoses: Base Editing and Therapeutic Delivery to the CNS.** *Diseases.* 7 (2019), 47.

COLELLA, P.; RONZITTI, G.; MINGOZZI, F. – **Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy.** *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development.* 8 (2018), 87-104.

EID, A.; ALSHAREEF, S.; MAHFOUZ, M. M. – **CRISPR base editors: genome editing without double-stranded breaks.** *Biochemical Journal.* 475 (2018), 1955-1964.

GAUDELLI, N. M.; KOMOR, A. C.; REES, H. A.; PACKER, M. S.; BADRAN, A. H.; BRYSON, D. I.; LIU, D. R. – **Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage.** *Nature.* 551 (2017), 464-471.

GEHRKE, J. M.; CERVANTES, O.; CLEMENT, M. K.; WU, Y.; ZENG, J.; BAUER, D. E.; PINELLO, L.; JOUNG, J. K. – **An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities.** *Nature Biotechnology.* 36 (2018), 977-982.

GLASS, Z.; LEE, M.; LI, Y.; XU, Q. – **Engineering the Delivery System for CRISPR-Based Genome Editing.** *Trends in Biotechnology.* 36 (2018), 173-185.

GRÜNEWALD, J.; ZHOU, R.; GARCIA, S. P.; IYER, S.; LAREAU, C. A.; ARYEE, M.; JOUNG, J. K. (2019a) – **Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors.** *Nature.* 569 (2019), 433-437.

GRÜNEWALD, J.; ZHOU, R.; IYER, S.; LAREAU, C. A.; GARCIA, S. P.; ARYEE, M. J.; JOUNG, J. K. (2019b) – **CRISPR DNA base editors with reduced RNA off-target and self-editing activities.** *Nature Biotechnology.* 37 (2019), 1041-1048.

GUERTS, M. H.; POEL, E.; AMATNGALIM, G. D.; OKA, R.; MEIJERS, F. M.; KRUISSELBRINK, E.; MOURIK, P.; BERKERS, G.; WINTER-DE GROOT, K. M.; MICHEL, S.; MUILWIJK, D.; AALBERS, B. L.; MULLENDERS, J.; BOJ, S. F.; SUEN, S. W. F.; BRUNSVELD, J. E.; JANSSENS, H. M.; MALL, M. A.; GRAEBER, S. Y.; BOXTEL, R.; ENT, C. K.; BEEKMAN, J. M.; CLEVERS, H. – **CRISPR-Based Adenine Editors Correct Nonsense Mutations in a Cystic Fibrosis Organoid Biobank.** *Cell Stem Cell.* 26 (2020), 503-510.

HESS, G. T.; TYCKO, J.; YAO, D.; BASSIK, M. C. – **Methods and Applications of CRISPR-Mediated Base Editing in Eukaryotic Genomes.** *Molecular Cell.* 68 (2017), 26-43.

HILTON, I. B.; GERSBACH, C. A. – **Enabling functional genomics with genome engineering.** *Genome Research.* 25 (2015), 1442-1455.

HUANG, C.; LEE, K.; DOUDNA, J. A. – **Applications of CRISPR-Cas Enzymes in Cancer Therapeutics and Detection.** *Trends in Cancer.* 4 (2018), 499-512.

KIM, K.; RYU, S.; KIM, S.; BAEK, G.; KIM, D.; LIM, K.; CHUNG, E.; KIM, S.; KIM, J. – **Highly efficient RNA-guided base editing in mouse embryos.** *Nature Biotechnology.* 35 (2017), 435-437.

KIM, Y. B.; KOMOR, A. C.; LEVY, J. M.; PACKER, M. S.; ZHAO, K. T.; LIU, D. R. – **Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions.** *Nature Biotechnology.* 35 (2017), 371-376.

KOBLAN, L. W.; DOMAN, J. L.; WILSON, C.; LEVY, J. M.; TAY, T.; NEWBY, G. A.; MAIANTI, J. P.; RAGURAM, A.; LIU, D. R. – **Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction.** *Nature Biotechnology.* 36 (2018), 843-846.

KOMOR, A. C.; KIM, Y. B.; PACKER, M. S.; ZURIS, J. A.; LIU, D. R. – **Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage.** *Nature.* 533 (2016), 420-424.

KOMOR, A. C.; ZHAO, K. T.; PACKER, M. S.; GAUDELLI, N. M.; WATERBURY, A. L.; KOBLAN, L. W.; KIM, Y. B.; BADRAN, A. H.; LIU, D. R. – **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.* 3 (2017), eaao4774.

KUSCU, C.; PARLAK, M.; TUFAN, T.; YANG, J.; SZLACHTA, K.; WEI, X.; MAMMADOV, R.; ADLI, M. – **CRISPR-STOP: gene silencing through base-editing-induced nonsense mutations.** *Nature Methods.* 14 (2017), 710-712.

LAUGHERY, M. F.; MAYES, H. C.; PEDROZA, I. K.; WYRICK, J. J. – **R-loop formation by dCas9 is mutagenic in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Nucleic Acids Research.* 47 (2019), 2389-2401.

LEE, C.; JO, D. H.; HWANG, G.; YU, J.; KIM, J. H.; PARK, S.; KIM, J.; KIM, J. H.; BAE, S. – **CRISPR-Pass: Gene Rescue of Nonsense Mutations Using Adenine Base Editors.** *Molecular Therapy.* 27 (2019), 1364-1371.

LEE, H. K.; WILLI, M.; MILLER, S. M.; KIM, S.; LIU, C.; LIU, D. R.; HENNIGHAUSEN, L. – **Targeting fidelity of adenine and cytosine base editors in mouse embryos.** Nature Communications. 9 (2018), 4804.

LEE, M.; KIM, H. – **Therapeutic application of the CRISPR system: current issues and new prospects.** Human Genetics. 138 (2019), 563-590.

LEE, S. H.; PARK, Y.; JIN, Y. B.; KIM, S.; HUR, J. K. – **CRISPR Diagnosis and Therapeutics with Single Base Pair Precision.** Trends in Molecular Medicine. 26 (2019), 337-350.

LEVY, J. M.; YEH, W.; PENDSE, N.; DAVIS, J. R.; HENNESSEY, E.; BUTCHER, R.; KOBLAN, L. W.; COMANDER, J.; LIU, Q.; LIU, D. R. – **Cytosine and adenine base editing of the brain, liver, retina, heart and skeletal muscle of mice via adeno-associated viruses.** Nature biomedical engineering. 4 (2020), 97-110.

LI, C.; LIEBER, A. – **Adenovirus vectors in hematopoietic stem cell genome editing.** FEBS Letters. 593 (2019), 3623-3648.

LI, C.; ZHANG, J. – **Stop-codon read-through arises largely from molecular errors and is generally nonadaptive.** PLoS Genetics. 15 (2019), e1008141.

LI, X.; QIAN, X.; WANG, B.; XIA, T.; ZHENG, Y.; DU, L.; XU, D.; XING, D.; DEPINHO, R. A.; LU, Z. – **Programmable base editing of mutated TERT promoter inhibits brain tumour growth.** Nature Cell Biology. 22 (2020), 282-288.

LI, X.; WANG, Y.; LIU, Y.; YANG, B.; WANG, X.; WEI, J.; LU, Z.; ZHANG, Y.; WU, J.; HUANG, X.; TANG, L.; CHEN, J. – **Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion.** Nature Biotechnology. 36 (2018), 324-327.

LI, Z.; DUAN, X.; AN, X.; FENG, T.; LI, P.; LI, L.; LIU, J.; WU, P.; PAN, D.; SU, X.; WU, S. – **Efficient RNA-guided base editing for disease modeling in pigs.** Cell Discovery. 4 (2018), 64.

LIANG, P.; DING, C.; SUN, H.; XIE, X.; XU, Y.; ZHANG, X.; SUN, Y.; XIONG, Y.; MA, W.; LIU, Y.; WANG, Y.; FANG, J.; LIU, D.; SONGYANG, Z.; ZHOU, C.; HUANG, J. – **Correction of β -thalassemia mutant by base editor in human embryos.** Protein and Cell. 8 (2017), 811-822.

LIM, C. K. W.; GAPINSKE, M.; BROOKS, A. K.; WOODS, W. S.; POWELL, J. E.; ZEBALLOS, M. A.; WINTER, J.; PEREZ-PINERA, P.; GAJ, T. – **Treatment of a mouse model of ALS by in vivo base editing.** Molecular Therapy. 28 (2020), 1177-1189.

LIN, X.; CHEN, H.; LU, Y.; HONG, S.; HU, X.; GAO, Y.; LAI, L.; LI, J.; WANG, Z.; YING, W.; MA, L.; WANG, N.; ZUO, E.; YANG, H.; CHEN, W. – **Base editing-mediated splicing correction therapy for spinal muscular atrophy.** *Cell Research.* 30 (2020), 548-550.

LIU, Z.; SHAN, H.; CHEN, S.; CHEN, M.; ZHANG, LAI, L.; LI, Z. – **Improved base editor for efficient editing in GC contexts in rabbits with an optimized AID-Cas9 fusion.** *FASEB Journal.* 33 (2019), 9210-9219.

LU, Z.; HUANG, X. – **Base editors: a powerful tool for generating animal models of human diseases.** *Cell Stress.* 2 (2018), 242-245.

LV, X.; QIU, K.; TU, T.; HE, X.; PENG, Y.; YE, J.; FU, J.; DENG, R.; WANG, Y.; WU, J.; LIU, C.; ZHAO, J.; GU, F. – **Development of a Simple and Quick Method to Assess Base Editing in Human Cells.** *Molecular Therapy - Nucleic Acids.* 20 (2020), 580-588.

MOLLA, K. A.; YANG, Y. – **CRISPR/Cas-Mediated Base Editing: Technical Considerations and Practical Applications.** *Trends in Biotechnology.* 37 (2019), 1121-1142.

MOON, S. B.; KIM, D. Y.; KO, J.; KIM, Y. – **Recent advances in the CRISPR genome editing tool set.** *Experimental and Molecular Medicine.* 51 (2019), 1-11.

NIDETZ, N. F.; MCGEE, M. C.; TSE, L. V.; LI, C.; CONG, L.; LI, Y.; HUANG, W. – **Adeno-associated viral vector-mediated immune responses: Understanding barriers to gene delivery.** *Pharmacology and Therapeutics.* 207 (2020), 107453.

NIGGEMANN, P.; GYÖRGY, B.; CHEN, Z. – **Genome and base editing for genetic hearing loss.** *Hearing Research.* (2020), 107958.

REES, H. A.; KOMOR, A. C.; YEH, W.; CAETANO-LOPES, J.; WARMAN, M.; EDGE, A. S. B.; LIU, D. R. – **Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery.** *Nature Communications.* 8 (2017), 15790.

REES, H. A.; LIU, D. R. – **Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells.** *Nature Reviews Genetics.* 19 (2018), 770-788.

REISINGER, E. – **Dual-AAV delivery of large gene sequences to the inner ear.** *Hearing Research.* (2019), 107857.

ROSSIDIS, A. C.; STRATIGIS, J. D.; CHADWICK, A. C.; HARTMAN, H. A.; AHN, N. J.; LI, H.; SINGH, K.; COONS, B. E.; LI, L.; LV, W.; ZOLTICK, P. W.; ALAPATI, D.; ZACHARIAS, W.; JAIN, R.; MORRISEY, E. E.; MUSUNURU, K.; PERANTEAU, W. H. – **In utero CRISPR-**

mediated therapeutic editing of metabolic genes. *Nature Medicine.* 24 (2018), 1513-1518.

RYU, S.; KOO, T.; KIM, K.; LIM, K.; BAEK, G.; KIM, S.; KIM, H. S.; KIM, D.; LEE, H.; CHUNG, E.; KIM, J. – **Adenine base editing in mouse embryos and an adult mouse model of Duchenne muscular dystrophy.** *Nature Biotechnology.* 36 (2018), 536-539.

SALSMAN, J.; DELLAIRE, G. – **Precision genome editing in the CRISPR era.** *Biochemistry and Cell Biology.* 95 (2017), 187-201.

SCHATOFF, E. M.; ZAFRA, M. P.; DOW, L. E. – **Base editing the mammalian genome.** *Methods.* 164-165 (2019), 100-108.

SHVETS, A. A.; KOLOMEISKY, A. B. – **Mechanism of Genome Interrogation: How CRISPR RNA-Guided Cas9 Proteins Locate Specific Targets on DNA.** *Biophysical Journal.* 113 (2017), 1416-1424.

SIMHADRI, V. L.; MCGILL, J.; MCMAHON, S.; WANG, J.; JIANG, H.; SAUNA, Z. E. – **Prevalence of Pre-existing Antibodies to CRISPR-Associated Nuclease Cas9 in the USA Population.** *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development.* 10 (2018), 105-112.

SONG, C.; JIANG, T.; RICHTER, M.; RHYM, L. H.; KOBLAN, L. W.; ZAFRA, M. P.; SCHATOFF, E. M.; DOMAN, J. L.; CAO, Y.; DOW, L. E.; ZHU, L. J.; ANDERSON, D. G.; LIU, D. R.; YIN, H.; XUE, E. – **Adenine base editing in an adult mouse model of tyrosinaemia.** *Nature Biomedical Engineering.* 4 (2020), 125-130.

STERNBERG, S. H.; REDDING, S.; JINEK, M.; GREENE, E. C.; DOUDNA, J. A. – **DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9.** *Nature.* 507 (2014), 62-67.

TREVISAN, M.; MASI, G.; PALÙ, G. – **Genome editing technologies to treat rare liver diseases.** *Translational Gastroenterology and Hepatology.* 5 (2020), 23.

VILLIGER, L.; GRISCH-CHAN, H. M.; LINDSAY, H.; RINGNALDA, F.; POGLIANO, C. B.; ALLEGRI, G.; FINGERHUT, R.; HÄBERLE, J.; MATOS, J.; ROBINSON, M. D.; THÖNY, B.; SCHWANK, G. – **Treatment of a metabolic liver disease by in vivo genome base editing in adult mice.** *Nature Medicine.* 24 (2018), 1519-1525.

WAGNER, D. L.; AMINI, L.; WENDERING, D. J.; BURKHARDT, L.; AKYÜZ, L.; REINKE, P.; VOLK, H.; SCHMUECK-HENNERESSE, M. – **High prevalence of Streptococcus**

pyogenes Cas9-reactive T cells within the adult human population. Nature Medicine. 25 (2019), 242-248.

WANG, X.; DING, C.; YU, W.; WANG, Y.; HE, S.; TANG, B.; XIONG, Y.; WEI, J.; LI, J.; LIANG, J.; LU, Z.; ZHU, W.; WU, J.; ZHOU, Z.; HUANG, X.; LIU, Z.; YANG, L.; CHEN, J. – **Cas12a Base Editors Induce Efficient and Specific Editing with Low DNA Damage Response.** Cell Reports. 31 (2020), 107723.

WANG, X.; LIU, Z.; LI, G.; DANG, L.; HUANG, S.; HE, L.; MA, Y.; LI, C.; LIU, M.; YANG, G.; HUANG, X.; ZHOU, F.; MA, X. – **Efficient Gene Silencing by Adenine Base Editor-Mediated Start Codon Mutation.** Molecular Therapy. 28 (2020), 431-440.

WU, W.; YANG, Y.; LEI, H. – **Progress in the application of CRISPR: From gene to base editing.** Medicinal Research Reviews. 39 (2019), 665-683.

XIAO, Y.; SHI, K.; QU, Y.; CHU, B.; QIAN, Z. – **Engineering Nanoparticles for Targeted Delivery of Nucleic Acid Therapeutics in Tumor.** Molecular Therapy - Methods and Clinical Development. 12 (2019), 1-18.

XU, C. L.; RUAN, M. Z. C.; MAHAJAN, V. B.; TSANG, S. H. – **Viral Delivery Systems for CRISPR.** Viruses. 11 (2019), 28.

YANG, Y.; CHEN, Y.; KAO, J.; CHING, C.; LIU, I.; WANG, C.; TSAI, C.; WU, F.; LIU, C.; CHEN, P.; CHEN, D.; YANG, H. – **Permanent Inactivation of HBV Genomes by CRISPR/Cas9-Mediated Non-cleavage Base Editing.** Molecular Therapy - Nucleic Acids. 20 (2020), 480-490.

YEH, W.; CHIANG, H.; REES, H. A.; EDGE, A. S. B.; LIU, D. R. – **In vivo base editing of post-mitotic sensory cells.** Nature Communications. 9 (2018), 2184.

ZENG, J.; WU, Y.; REN, C.; BONANNO, J.; SHEN, A. H.; SHEA, D.; GEHRKE, J. M.; CLEMENT, K.; LUK, K.; YAO, Q.; KIM, R.; WOLFE, S. A.; MANIS, J. P.; PINELLO, L.; JOUNG, J. K.; BAUER, D. E. – **Therapeutic base editing of human hematopoietic stem cells.** Nature Medicine. 26 (2020), 535-541.

ZENG, Y.; LI, J.; LI, G.; HUANG, S.; YU, W.; ZHANG, Y.; CHEN, D.; CHE, J.; LIU, J.; HUANG, X. – **Correction of the Marfan Syndrome Pathogenic FBNI Mutation by Base Editing in Human Cells and Heterozygous Embryos.** Molecular Therapy. 26 (2018), 2631-2637.

ZHANG, Y.; QIN, W.; LU, X.; XU, J.; HUANG, H.; BAI, H.; LI, S.; LIN, S. – **Programmable base editing of zebrafish genome using a modified CRISPR-Cas9 system.** Nature Communications. 8 (2017), 118.

ZHOU, C.; SUN, Y.; YAN, R.; LIU, Y.; ZUO, E.; GU, C.; HAN, L.; WEI, Y.; HU, X.; ZENG, R.; LI, Y.; ZHOU, H.; GUO, F.; YANG, H. – **Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis.** Nature. 571 (2019), 275-278.

ZONG, Y.; SONG, Q.; LI, C.; JIN, S.; ZHANG, D.; WANG, Y.; QIU, J.; GAO, C. – **Efficient C-to-T base editing in plants using a fusion of nCas9 and human APOBEC3A.** Nature Biotechnology. 36 (2018), 950.

ZUO, E.; SUN, Y.; WEI, W.; YUAN, T.; YING, W.; SUN, H.; YUAN, L.; STEINMETZ, L. M.; LI, Y.; YANG, H. – **Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos.** Science. 364 (2019), 289-292.

8. Anexos

Anexo I – Janela de atividade e PAM de alguns CBEs e ABEs mais relevantes. A PAM está sombreada a azul e as janelas de atividade estão sombreadas a verde, nos CBEs, e a vermelho, nos ABEs. A seta vermelha indica o local de corte pela nCas9. (Adaptado de Rees e Liu, 2018)

	Janela de Atividade e PAM
BE1	
BE2	
BE3	
BE4	
ABE7.9	
ABE7.10	
BE4-Gam	
Cas12a-BE	

Anexo 2 – Aplicações dos BEs, respetivos modos de entrega às células resultados

BE usado	Modo Entrega	Patologia	Gene alvo	Resultados	Efeitos off-target / Indels	Referências
ABE	-----	Atrofia Muscular Espinhal	SMN2	Correção do <i>splicing</i> do exão 7 do gene alvo	Não detetável	Lin et al., 2020
BE3	Injeção	β -talassemia	HBB-28	>23% edição	Não detetável	Liang et al., 2017
BE3	Adenovírus	Dislipidemia	ANGPTL3	35% edição	-----	Chadwick et al., 2018; Li e Lieber, 2019
BE3	Adenovírus	Dislipidemia	PCSK9	24% edição, levando a >50% redução da proteína Pcsk9 no plasma	Sem evidência	Carreras et al., 2019; Chadwick et al., 2017; Li e Lieber, 2019
ABE 7.10	AAV <i>trans-splicing</i>	Distrofia Muscular de Duchenne	Dmd	Expressão distrofina restaurada em 17%	Não detetável	Ryu et al., 2018
BE3	AAV <i>split-intein</i>	Esclerose Lateral Amiotrófica	SOD1	Redução da atrofia muscular (Redução de 65% da proteína SOD1)	Não detetável	Lim et al., 2020
BE3	Mediada por lípidos	Deficiência na regeneração celular sensorial no ouvido interno	CTNNB1	Evita a fosforilação da β -catenina (31% edição)	Níveis baixos/ não detetável	Yeh et al., 2018
BE3	AAV <i>split-intein</i>	Fenilcetonúria	PAH	Níveis de Phe reduzidos a níveis fisiológicos	Não detetável	Trevisan et al., 2020; Villiger et al., 2018
ABE	Eletroporação	Fibrose Cística	CFTR	8.88% edição	Não detetável	Guerts et al., 2020
BE4 Gam	Lentivírus	Infeção crónica pelo Vírus da Hepatite B	cccDNA episossomal viral	Redução da secreção de HBsAg	Níveis baixos	Yang et al., 2020
			Gene da polimerase e de superfície	Supressão da replicação viral		
CBE	AAV <i>split-intein</i>	Doença Niemann-Pick tipo C	NPCI	Aumento do nº de neurónios Purkinje de 24% para 38%	Não detetável	Levy et al., 2020
BE3	Transfecção do complexo RNP	Síndrome de Marfan	FBNI	Alta eficiência de edição	Níveis baixos	Zeng et al., 2018
ABE 6.3	Mediada por lípidos	HTI	FAH	Baixa eficiência (6.9% edição)	Níveis baixos	Song et al., 2020
BE3	-----	HTI	Hpd	15% edição	Não detetável	Rossidis et al., 2018
ABE	AAV2	Tumor cerebral	TERT	Indução de senescência das células cancerosas	Não detetável	Li et al., 2020
ABE max	Eletroporação	XPC	XPC	Taxa de conversão codão stop em Trp >10%. Expressão total da proteína XPC	Não detetável	Lee, Jo et al., 2019

Legenda: ANGPTL3 – Angiopoietina 3 (do inglês: *Angiopoietin-like 3*); cccDNA – DNA circular covalentemente fechado (do inglês: *covalently closed circular DNA*); CFTR – Regulador de condutância transmembranar da Fibrose Cística (do inglês: *Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator*); FAH – Fumarilacetoacetato Hidrolase (do inglês: *Fumarylacetoacetate Hydrolase*); HBsAg – Antígeno de superfície viral (do inglês: *Hepatitis B surface antigen*); HTI – Tirosinemia Hereditária tipo I (do inglês: *Hereditary Tyrosinemia type I*); LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade (do inglês: *low-density lipoprotein*); PAH – Fenilalanina Hidroxilase (do inglês: *Phenylalanine Hydroxylase*); PCSK9 – Proproteína Convertase subtilisina/cexina tipo 9 (do inglês: *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*); Phe – Fenilalanina (do inglês: *Phenylalanine*); SMN2 – Neurônio Motor de Sobrevivência 2 (do inglês: *Survivor Motor Neuron 2*); SOD1 – Superóxido Dismutase I (do inglês: *Superoxide Dismutase I*); Trp – Triptofano; XPC – Xerodermia Pigmentosa, grupo de complementação C (do inglês: *Xeroderma Pigmentosum, complementation group C*)