

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Giovanna Sanches Ribeiro

**ANÁLISE DE TÉCNICAS DE MODULAÇÃO GÊNICA NO AUXÍLIO À REJEIÇÃO
NOS TRANSPLANTES**

São Paulo
2023

Giovanna Sanches Ribeiro

**ANÁLISE DE TÉCNICAS DE MODULAÇÃO GÊNICA NO AUXÍLIO À REJEIÇÃO
NOS TRANSPLANTES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Prof. Dr. Mauro Fantini Nogueira Martins, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

**São Paulo
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecas São Camilo

Ribeiro, Giovanna Sanches

Análise de técnicas de modulação gênica no auxílio à rejeição nos transplantes / Giovanna Sanches Ribeiro. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2023.

39 p.

Orientação de Mauro Fantini Nogueira Martins.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2023.

1. Biotecnologia 2. Células-tronco pluripotentes induzidas 3. MicroRNAs
4. Proteína 9 associada à CRISPR 5. Transplantes I. Martins, Mauro
Fantini Nogueira II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 573.21

Giovanna Sanches Ribeiro

**ANÁLISE DE TÉCNICAS DE MODULAÇÃO GÊNICA NO AUXÍLIO À REJEIÇÃO
NOS TRANSPLANTES**

São Paulo, 24 de outubro de 2023.

Professor Orientador – Prof. Dr. Mauro Fantini Nogueira Martins

Professor Examinador Interno – Prof. Dr. Fábio Mitsuo

Professor Examinador Externo – Prof. Dr. Roberto Rudge de Moraes Barros

**São Paulo
2023**

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus que tem me sustentado até esse momento.

Aos meus pais e a toda a minha família pelo apoio, pelo investimento e por toda a confiança que depositaram em mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mauro Fantini, por toda a paciência, e por cada colocação que acredito ter sido essencial para todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao Centro Universitário São Camilo, por tudo que oferece desde a infraestrutura até cada um dos profissionais.

Aos colegas do campo de estágio, que acreditaram em mim, além de me orientarem diante das minhas dificuldades.

A todos os meus amigos de dentro e fora da universidade, que estiveram sempre comigo, e foram extremamente importantes nesse processo.

RESUMO

Os transplantes vêm sendo utilizados como método curativo ao longo de muitos anos, no entanto grandes problemas o acompanham, sendo os principais a baixa disponibilidade de órgão para serem transplantados, e a dificuldade em estabelecer a compatibilidade entre dois indivíduos não idênticos. Além das adversidades acarretadas por meio da utilização das terapias imunossupressoras. Neste trabalho, a partir de uma revisão bibliográfica livre será analisada a eficiência e a aplicabilidade de métodos moleculares que visam a alteração da expressão de determinada região genômica como o miRNA e o CRISPR-Cas9, ou a partir da recodificação celular decorrente do iPSC, com o objetivo de impedir ou adiar o processo de rejeição ao enxerto. Foi evidenciado que diferentes métodos podem ser utilizados de maneiras distintas, assim apresentando eficácias divergentes entre si, o miRNA é o método que possui mais literatura disponível, assim apresentando resultados mais tangíveis e aplicáveis clinicamente, assim como o CRISPR-Cas9 que vem sendo utilizado em diferentes vertentes pretendendo cercear as traves impostas pelas diferenças genéticas, no entanto o iPSC não tem sido muito aplicado nesse campo, contudo os poucos resultados mostram uma possibilidade a ser explorada. De maneira geral todos os métodos apresentam resultados relevantes, sendo o miRNA mais eficiente visto que pode atuar como biomarcador; imunomodelador; modificador da expressão genética, além disso são moléculas biocompatíveis diminuindo riscos associados, da mesma maneira as outras técnicas apresentam um campo promissor que deve ser cada vez mais explorado.

Palavras-chave: Transplantes. Biotecnologia. Tolerância. miRNA. CRISPR-Cas9. iPSC.

ABSTRACT

Transplants have been used as a curative method for many years, however major problems accompany it, the main ones being the low availability of organs to be transplanted, and the difficulty in establishing compatibility between two non-identical individuals. In addition to the adversities caused by the use of immunosuppressive therapies. In this thesis, from a free bibliographic review will be analyzed the efficiency and applicability of molecular methods aimed at altering the expression of a particular gene such as miRNA and CRISPR-Cas9, or from the cellular recoding due to iPSC, with the aim of preventing or postponing a process of graft rejection. It was evidenced that different methods can be used in different ways, thus presenting divergent efficacies among themselves, miRNA is the method with the most literature available, thus presenting more tangible and clinically applicable results, as well as CRISPR-Cas9 which has been used in different aspects intending to curtail the beams imposed by genetic differences however, the iPSC has not been widely applied in this field, however the few results show a possibility to be explored. In general, all methods present relevant results, and miRNA is more efficient since it can act as a biomarker; immunomodulator; modifier of gene expression, in addition, they are biocompatible molecules decreasing associated risks, in the same way, the other techniques present a promising field that must be increasingly explored.

Keywords: Transplants. Biotechnology. Tolerance. miRNA. CRISPR-Cas9. iPSC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de formação do miRNA.....	17
Figura 2 - Comparação da sobrevivência do enxerto ao longo dos dias em relação a diferentes compostos administrados.....	19
Figura 3 - Comparação entre diferentes administrações comparado ao percentual de sobrevivência ao longo dos dias.....	20
Figura 4 - Comparação entre o controle e a aplicação de miR-122 em relação a sobrevivência ao longo dos dias dos animais testados.....	21
Figura 5 - Representação esquemática dos mecanismos de reparo por extremidades não homologas e dependentes de homologia, respectivamente.....	24
Figura 6 - Primeiro suíno nascido com o retrovírus PERV inativado, com dois dias após o nascimento.....	25
Figura 7 - Representação da análise de regressão não linear das curvas de morte obtidas a partir do ensaio em sete pontos de diluição.....	27
Figura 8 - Análise da diferença da interpretação entre soro e células suínas pré e pós processo de retirada de anticorpos contra carboidratos.....	28
Figura 9 - Análise de interação entre os soros de diferentes pacientes em contato com as células suínas modificadas mononucleadas do sangue periférico.....	29
Figura 10 - Esquema da elaboração de iPSC.....	30
Figura 11 - Desenvolvimento ao longo do tempo dos iPSC hepáticos.....	31
Figura 12 - Diferentes abordagens para aplicação de terapias a partir de iPSC.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação entre diferentes tipos de rejeição ao enxerto.....	12
Tabela 2 - Esquema de modificações realizadas por Butler et al. (2015) em células suínas.....	26

LISTA DE SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
miRNA	Micro RNA
CRISPR-Cas9	Conjunto de Repetições Palindrômicas Regularmente Espaçadas em associação com a nuclease Cas9
iPSC	Células tronco pluripotente induzidas
mRNA	RNA mensageiro
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
Ran-GTP	Pequena GTPase
RISC	Complexo silenciador induzido por RNA
IL-10	Interleucina 10
miR -98	Perfil de miRNA 98
miR-182	Perfil de miRNA 182
miR-155	Perfil de miRNA 155
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
CD40	Proteína transmembranar tipo I
CD86	Proteína expressa constitutivamente em células dendríticas
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
miR-122	Perfil de miRNA 122
PERV	Retrovírus suínos endógenos
gRNA	RNA guia
GGTA1	Glicoproteína alfa-galactosiltransferase 1
CMAH	CMP-Neu5Ac Hidroxilase
B4GalNT2	Beta-1,4 N-acetilgalactosaminiltransferase 2
hCRP	Proteína reguladora do sistema complemento
DKO	Gene com duas deleções
DKO CD55+	Gene com duas deleções associado a hCRP
TKO	Gene com três deleções
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
HLA	Antígeno leucocitário humano
SLA	Antígeno leucocitário suíno

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
3. MÉTODOS.....	15
4. DESENVOLVIMENTO.....	16
4.1 miRNA.....	16
4.2 CRISPR-Cas9.....	23
4.3 iPSC	30
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
REFERÊNCIAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados mais recentes disponibilizados pelo Ministério da Saúde mais de 65.000 pessoas estão na fila de espera para um transplante, equivalente à população da cidade de Bertioga, em São Paulo. Consonante a esse dado, o número de transplantes realizados não chega a 11.000 cirurgias, ou seja, mesmo que exista um crescimento no investimento na área e o Brasil possua o maior programa público de transplantes do mundo, ainda há um gargalo considerável a ser corrigido (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2023).

Mesmo que os entraves técnicos cirúrgicos tenham sido superados o maior problema enfrentado são os efeitos da resposta imunológica contra o enxerto, devido a incompatibilidade genética por isso o controle da resposta imune e o aumento da compatibilidade entre doador e receptor seriam fundamentais para solução dessa questão (KOROBINSKI et al., 2012).

Sendo que esse processo de rejeição pode ocorrer de diferentes maneiras, com padrões imunológicos distintos, e até intervalos de tempo divergentes (DELVES et al., 2013). Conforme síntese na tabela 1:

Tabela 1 – Relação entre diferentes tipos de rejeição ao enxerto

Tipo de rejeição	Intervalo de tempo	Mecanismo imunológico
Hiperaguda	Minutos	Anticorpos já existentes; sistema complemento
Aguda	Dias	Ativação linfocitária
Crônica	Meses a anos	Não bem determinada, envolvimento de anticorpos; reaparecimento de doenças

Fonte: Adaptado de Delves et al., 2013.

Atualmente a terapia imunossupressora é considerada o melhor caminho para aumentar a qualidade e sobrevida tanto do paciente quanto do enxerto, através do controle da rejeição por meio de diferentes mecanismos (TIZO; MACEDO, 2015). No entanto, essa terapia imunossupressora além de não possuir total eficiência, pode em algumas situações levar a problemas secundários, como as infecções que são a principal causa de morte em transplantados no Brasil (RIELLA, 2018).

Por isso, nos últimos anos, muito tem se estudado como novas tecnologias poderiam auxiliar no controle da rejeição, o que auxiliaria tanto na disponibilidade por

abrir novas possibilidades de captação de órgãos, quanto na compatibilidade já que haveria maior possibilidade de controle de determinadas regiões gênicas (HARDEN; KRAMS, 2018).

Uma ferramenta importante nesse campo de estudo é a modulação gênica, que por meio de modificações no DNA e seus produtos, a partir de técnicas como miRNA; CRISPR-Cas9 e iPSC, podem levar a uma alteração no perfil da resposta inflamatória ao enxerto, ou seja, um controle no processo de rejeição (WELMAN et al., 2015).

No entanto, ainda existem muitas questões que precisam ser abordadas quanto a utilização dessas ferramentas para auxílio no transplante. Tanto do ponto de vista ético, quanto do lado imunológico, porquanto ainda há incertezas em relação a relevância de determinados genes e proteínas no processo de rejeição, além do possível desenvolvimento de problemas associados a modulação gênica (KOROBINSKI et al., 2012).

Através desse cenário cria-se caminhos entre os problemas relacionados ao transplante, e a especificidade que a biologia molecular promove, sugerindo que uma sinergia das duas áreas possa abrir uma nova era da terapia dos transplantes.

2. OBJETIVOS

Analisar a partir da bibliografia disponibilizada em banco de dados, a eficiência e aplicabilidade de técnicas de modulação gênica com a finalidade de evitar ou postergar uma reação de rejeição a um transplante.

3. MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido a partir de uma revisão bibliográfica narrativa com base em livros e artigos científicos na língua portuguesa e inglesa, publicados entre os anos de 1980 a 2023 identificados em diferentes bases de dados, como Pubmed; Scielo; LILACS e Google Acadêmico, dentro do período de outubro de 2022 até julho de 2023. Sendo utilizadas as seguintes palavras-chaves: transplante; rejeição; modulação gênica; tolerância; miRNA; CRISPR-Cas9; iPSC.

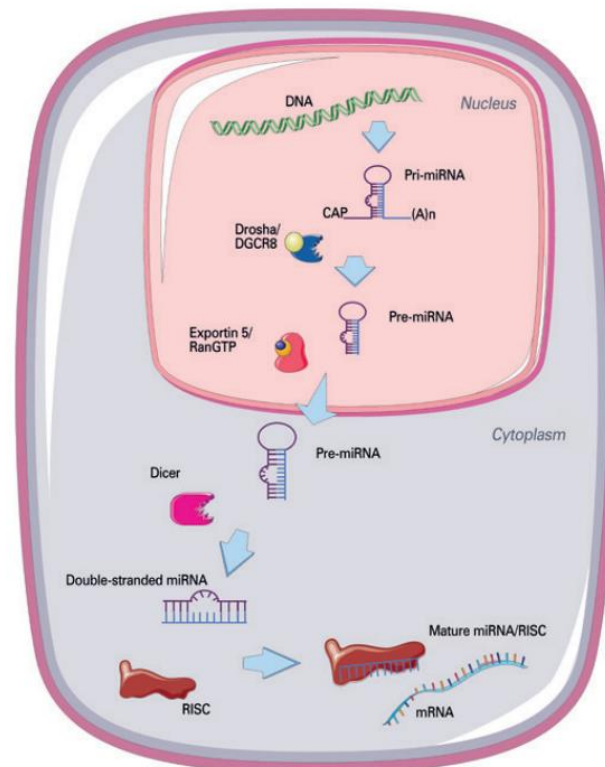
4. DESENVOLVIMENTO

4.1 miRNA

Com o desenvolvimento de estudos na área da biologia molecular, os microRNAs (miRNAs) estão cada vez mais evidentes, sendo moléculas pertencentes ao genoma humano que são responsáveis por regular negativamente determinadas regiões gênicas, a partir da formação do complexo silenciador induzido por RNA (RISC), que é alvo específico e ao se associar impede a tradução do RNA mensageiro (BARTEL, 2004). Isso permite uma relação entre perfis de miRNA e tipos celulares, onde cada perfil está associado ao desenvolvimento, diferenciação e função da célula, possibilitando assim a utilização desses mecanismos para a quantificação e identificação dos perfis celulares em situações pré e pós transplante, ou até mesmo abre caminhos para a modulação da resposta inflamatória após um transplante, ou outras doenças como algumas neoplasias, hepatite C crônica (SALIMINEJAD et al., 2018).

Essa molécula de miRNA passa por um processo complexo de formação, onde ainda no núcleo, a sequência codificadora é transcrita pela ação da RNA Polimerase II formando o miRNA primário, depois sofrerá ação do complexo enzimático RNase III Drosha e a proteína Pasha, que irá retirar estruturas adicionais da molécula deixando apenas o miRNA precursor (70 nucleotídeos), esse miRNA precursor então será transportado para o citoplasma pela ação da exportina-5 e Ran-GTP onde, já no citoplasma haverá atuação da enzima Dicer que irá remover uma parte da molécula, originando de fato o miRNA de fita dupla com 22 nucleotídeos, então esse miRNA irá se associar ao complexo de proteínas denominado RISC, que irá levar a separação das fitas, onde uma será degradada e a outra ficará disponível para se parear ao mRNA alvo conforme esquema da figura 1 (LIMA et al., 2021).

Figura 1: Processo de formação do miRNA



Fonte: Lima et al., 2021.

Além do processo de formação, para ter efetivação nas suas atividades biológicas é importante que o miRNA seja complementar a uma determinada sequência do mRNA, nesse processo pode haver variações quanto ao pareamento e/ou complementariedade o que pode resultar em uma interação mais estável ou não (O'BRIEN, 2018).

A interação com o alvo no mRNA está associada à inibição da transcrição, e depende da participação de diferentes proteínas. Mas já foi observado que quando o alvo é uma região promotora, no lugar de inibição pode ser observado uma potencialização da expressão de determinada região gênica (DHARAP, 2013).

Quanto ao mecanismo da inibição, pode ser decorrente tanto do encaixe das moléculas, ou quando a complementariedade é alta pode ocorrer clivagem do mRNA, levando a um processo inibitório permanente. No entanto, um estudo evidenciou que mesmo que haja pareamento parcial, apenas o encaixe das moléculas também pode inibir permanentemente a tradução daquele gene, diferentemente do que acreditavam (WEI et al., 2012). Além disso, é importante pontuar que como diferentes miRNAs possuem diferentes alvos, sua atividade final pode variar, levando a diferentes efeitos

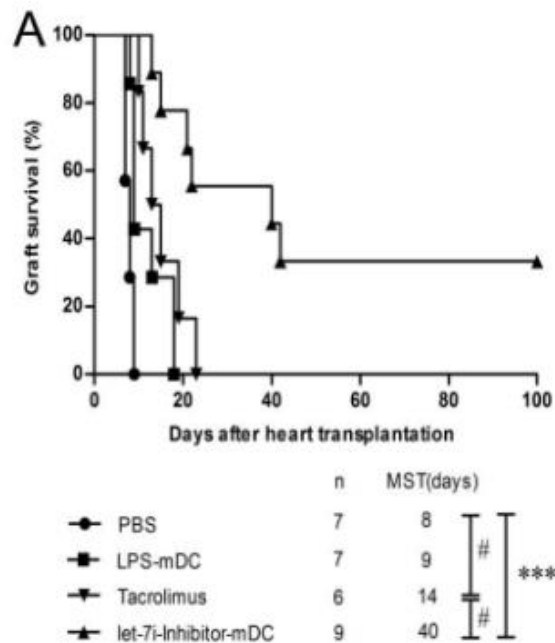
em diferentes perfis celulares, por isso para aplicação dessas moléculas em modelos terapêuticos é de extrema relevância estudos e modelos bioinformáticos para compreender a relação que os miRNAs podem apresentar em um contexto geral.

Como os diferentes perfis de miRNAs podem variar no seu alvo, isso mostra que suas atividades também não serão as mesmas. O que possibilita que atue em atividades como na regulação do desenvolvimento e diferenciação celular, embriogênese, apoptose, entre outras atividades que estão relacionadas com a presença ou não de células, e por serem perfis associados, presença de quais células (HARDEN e KRAMS, 2018).

Permitindo uma relevante associação com o sistema imune, onde os miRNAs possuem um importante papel nas grandes classes de células, como as dendríticas, linfócitos B e linfócitos T, e a partir disso cria-se a possibilidade da criação de uma relação entre o conhecimento dessas moléculas e células aplicadas ao transplante, e outras doenças como câncer, hepatite, entre outras.

Conforme pontuado as células citadas possuem papéis importantes no desenrolar da resposta a um enxerto, como as células dendríticas, que atuam como células apresentadoras de antígenos sendo mediadores importantes nessa cascata de sinalização (MORELLI e THOMSON, 2007). No contexto das células dendríticas há uma grande relevância do miRNA Let-7i, que regula a maturação dessas células. Estudos utilizaram mimetizadores e inibidores da molécula para mostrar a sua relação com a regulação negativa da interleucina 10 (IL-10), sendo assim a presença de Let-7i indica a presença de uma regulação negativa na expressão de interleucinas associadas a atividades anti-inflamatórias, e também mostrou um aumento na expressão de citocinas pró inflamatórias. Isso foi identificado a partir da realização de um transplante cardíaco entre ratos evidenciando que com a aplicação de células dendríticas com o gene para Let-7i inibido ocorreu um prolongamento e maior preservação do enxerto transplantado, como pode ser analisado na figura 2 (SUN et al., 2016).

Figura 2: Comparação da sobrevivência do enxerto ao longo dos dias em relação a diferentes compostos administrados.

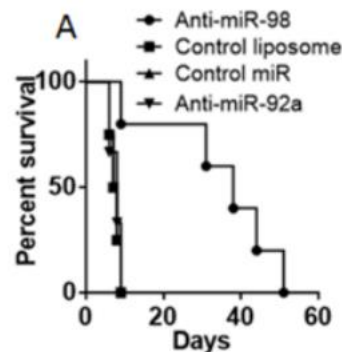


Fonte: Sun et al., 2016.

Quanto às células B, existem muitas evidências que mostram a alta capacidade desses linfócitos em suprimir o sistema imune auxiliando no suporte ao enxerto transplantado, e o principal ponto associado a essa eficiência é a capacidade em secretar IL-10 (DURAND; CHIFFOLEAU, 2015). No entanto artigos evidenciam que a expressão do miR-98 em células B está associada com a regulação negativa da região gênica responsável pela produção de IL-10 (DANGER et al., 2012).

Seguindo esse raciocínio um grupo de pesquisa realizou transplantes cardíacos em ratos, e aplicou intraperitonealmente anti miR-98 através de lipossomos, a partir desses procedimentos foi possível identificar que o grupo controle (administração intraperitoneal de salina) viveu 10 dias a menos comparados a aqueles que receberam a administração de anti miR-98, que viveram mais de 30 dias, como pode ser observado na figura 3 (SONG et al., 2017).

Figura 3: Comparação entre diferentes administrações comparado ao percentual de sobrevivência ao longo dos dias.



Fonte: Song, et al., 2017

Já abordando os linfócitos T, foi pontuado que são as células com maior responsabilidade no processo de rejeição e tolerância (NAPIMOGA et al., 2008), e associando essa atividade com os miRNAs foi visto que em um processo de rejeição além de uma quantidade aumentada de células T, também pode ser observado um aumento considerável na expressão de miR-182 (HAMDORF et al., 2017).

Pesquisadores demonstraram que a associação da depleção do gene do miR-182 com o bloqueio de receptores que atuam como coestimuladores da produção de células T, aumentou de maneira significativa a sobrevida do enxerto cardíaco de camundongos (WEI et al., 2017). Evidenciando que o sistema imune é formado por complexas sinalizações, o que mostra que a utilização e o conhecimento dos mecanismos do miRNA abre caminhos para uma terapia sinérgica, situação em que ainda há aplicação das terapias convencionais, mas oferece uma maior eficiência e segurança.

Além disso, muito tem se estudado sobre a aplicação do miR-155, pois é observada a associação dessa molécula com diferentes doenças (HARRIS et al., 2010). No caso dos transplantes foi demonstrado que a desativação do gene que expressa esse miRNA levava à diminuição da expressão de algumas proteínas como MHC-II, CD40 e CD86 em algumas células fagocitárias que são responsáveis pela apresentação de antígenos, como as células Kupffer no caso de transplantes hepáticos, diminuindo assim a reação inflamatória no local e por consequência prolongando a sobrevida do enxerto (LI et al., 2014). Ou seja, os miRNAs possuem uma influência direta no sistema imune, e ainda é possível relacionar processos de tolerância e rejeição a essas moléculas. Baseado nos dados apresentados, os

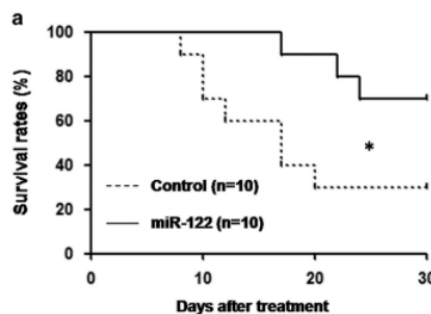
miRNAs podem ser utilizados em duas vertentes para auxílio nos transplantes: tanto para serem identificados como biomarcadores associados a rejeição ou a tolerância a determinado enxerto, quanto para serem utilizados como terapia antirrejeição.

No primeiro cenário, os diferentes perfis de miRNAs podem ser quantificados em uma amostra biológica para verificação do cenário do paciente pós transplante. A partir de estudos foi associado que as moléculas de miRNAs são importantes biomarcadores por serem fáceis de detectar, além de serem encontradas de forma precoce sem a necessidade de aguardar longos períodos e janelas para identificação (KHAN et al., 2019).

Essas moléculas podem ser identificadas através de técnicas como RT-qPCR, apresentando a partir da amplificação da região alvo, uma possível identificação e quantificação. Também podem ser utilizadas técnicas com maior ou menor grau de complexidade, como sequenciamento, microarray, northern blot (CONDRAT et al., 2020).

Enquanto no segundo caso, onde temos a molécula de mi-RNA como terapia antirrejeição, muito tem sido procurado quanto a aplicação de inibidores de miRNAs (WEI et al., 2017) ou das próprias moléculas de miRNA (WANG et al., 2017) principalmente por conta dos problemas associados à terapia imunossupressora tradicionalmente utilizada em pacientes pós transplante. Um exemplo bem sucedido de pesquisas nessa área é o de Wang e colaboradores (2017), que observaram que ratos que rejeitavam transplantes de córnea tinham níveis relativamente baixos de miR122. A partir desse conhecimento, os pesquisadores realizaram infusões de miR122 em ratos que haviam sido transplantados e houve aumento na sobrevivência da córnea, em comparação ao controle (figura 4). Isso mostra o potencial de eficiência da aplicação dos miRNAs no processo de suporte ao enxerto.

Figura 4: Comparação entre o controle e a aplicação de miR-122 em relação a sobrevivência ao longo dos dias dos animais testados.



Fonte: Wang et al., 2017

A manipulação de miRNAs apresenta resultados otimistas para o cenário dos transplantes, mas não é a única forma de intervenção molecular que vem sendo estudada, como veremos a seguir.

4.2 CRISPR-Cas9

Com a problematização quanto a disponibilidade de órgãos para transplantes, um caminho encontrado para solucionar essa questão foi captar enxertos de espécies diferentes, sendo a mais adequada para a situação, a captação de órgãos de suínos (COWAN e TECTOR, 2017). No entanto, mesmo que seja a espécie mais apropriada para esse tipo de transplante, por diversos fatores esse processo pode gerar problemas ao receptor (REESE et al., 2022). Devido a essa questão o avanço no desenvolvimento da modulação genética tem criado um cenário mais seguro para os xenotransplantes.

Como citado, alguns fatores podem dificultar a eficiência e a eficácia de um xenotransplante, sendo os mais relevantes, fatores imunológicos, devido a expressão de antígenos que podem interagir com anticorpos presentes em humanos além da infecção suína por PERV – retrovírus suínos endógenos, e também a interferência do complexo principal de histocompatibilidade (REESE et al., 2022).

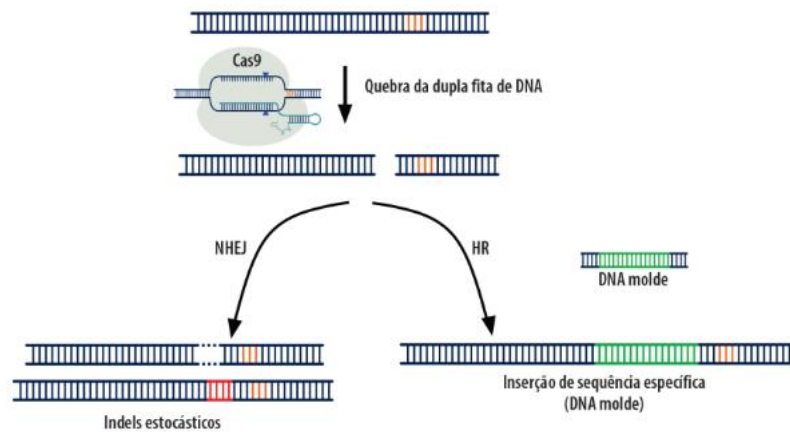
Sendo assim, a modificação genética de suínos é um processo muito importante para o xenotransplante, todavia laboratorialmente sempre houve muita dificuldade e pouca eficiência na produção de suínos modificados, pois as técnicas existentes não permitiam muitas modificações, sendo que nesse contexto são necessárias múltiplas deleções ou alterações. Posto isso, o conhecimento e desenvolvimento da CRISPR-Cas9 revolucionou a edição genética, assim como os processos associados ao xenotransplante, permitindo modificações cada vez mais específicas (KNOTT e DOUDNA, 2018).

Foram encontradas em algumas bactérias regiões curtas palindrômicas agrupadas e inter espaçadas, conhecidas como CRISPR, que associadas a enzimas Cas9, formam um importante fator pertencente ao sistema imune dessas bactérias, pois são capazes de reconhecer e clivar possíveis invasores (HAFT et al., 2005). Utilizando o mecanismo bacteriano, as vencedoras do prêmio Nobel, Charpentier e Doudna desenvolveram a associação CRISPR-Cas9 visando a edição genética.

A programação de uma sequência molde, que pode ser direcionada à região alvo de escolha, junto à enzima Cas9 e ao RNA guia (gRNA), irão promover a localização do alvo e clivagem da região, sendo assim a partir de mecanismos de junção de extremidades não homologas ou reparo dependente de homologia, a região

pode ser reconstituída, conforme esquema na figura 5 (CHARPENTIER e DOUDNA, 2013).

Figura 5: Representação esquemática dos mecanismos de reparo por extremidades não homologas e dependentes de homologia, respectivamente.



Fonte: Molinari et al., 2020.

Com o avanço dos estudos, foi possível identificar a capacidade que a CRISPR-Cas9 possui relacionada à edição do genoma de diferentes tipos celulares (JINEK et al., 2013). Atualmente o uso da técnica pode ser aplicado em diferentes frentes, como na inativação de genes relacionadas a doenças neurológicas (GAJ et al., 2017), eliminação de um cromossomo em células tronco pluripotentes humanas aneuplóides (ZUO et al., 2017), projeção de células T visando o desenvolvimento de novas imunoterapias para neoplasias (RUPP et al., 2017), inativação de retrovírus em suínos (NIU et al., 2017), entre outras aplicabilidades. Portanto a CRISPR-Cas9 permite um maior controle na alteração e regulação do genoma, mostrando ter um grande potencial para atuar no campo dos transplantes.

Conforme citado uma grande barreira para o xenotransplante é o PERV que se trata de um grupo de retrovírus que podem ser encontrados no genoma dos suínos e possuem potencial para serem transmitidos e infectar humanos, além disso sua integração no genoma humano pode levar a imunodeficiência ou ao desenvolvimento de neoplasias, conforme foi relatado em outras infecções por retrovírus (DENNER, 2016).

Visando esse obstáculo, um grupo de pesquisa utilizou o método da CRISPR-Cas9 para inativação do PERV em células suínas. Foram selecionadas células primárias de fibroblastos fetais suínos e os autores realizaram o mapeamento das sequências das regiões do genoma onde diferentes PERVs estavam localizados. Com

isso desenvolveram os gRNAs específicos para cada região, e então as células foram submetidas ao complexo da CRISPR-Cas9 por 12 dias, sendo observado 37% de inativação do PERV (NIU et al., 2017).

Outros dados mostraram que 35% das células tiveram alta eficiência em serem editadas, enquanto 61% evidenciaram uma baixa eficiência no resultado, o artigo apresentou a hipótese desses valores estarem associados com as múltiplas clivagens no genoma que a CRISPR-Cas9 promovia, podendo levar a indução de danos. Por isso, além da submissão ao complexo, também foi realizado o tratamento das células com inibidores da apoptose e fatores de crescimento celular, com isso houve um crescimento de 100% de células com o PERV comprovadamente inativado e sem variações estruturais (NIU et al., 2017).

Isso permitiu a produção de embriões com o PERV inativado via transferência nuclear de células somáticas, levando à produção eficiente de suínos com o PERV inativado, e sem mudanças estruturais genéticas. Até a publicação do artigo, o suíno mais velho já estava com 4 meses sem apresentar problemas associados às modificações genéticas, como pode ser observado na figura 6 (NIU et al., 2017). A produção eficiente de suínos geneticamente modificados, permite que a utilização de órgãos de uma outra espécie para um transplante seja cada vez mais real, visto que as barreiras imunológicas são analisadas e contornadas.

Figura 6: Primeiro suíno nascido com o retrovírus PERV inativado, com dois dias após o nascimento.



Fonte: Niu et al., 2017.

Outro problema associado à aplicação dos xenotransplantes é a questão imunológica, pois já é descrito na literatura que existe uma relação do transplante xenogênico e a reação hiperaguda mediada por anticorpos e uma importante atuação do sistema complemento, nesse tipo de reação o que ocorre é a atividade de

anticorpos pré existentes que se ligam a antígenos presentes no endotélio do enxerto proveniente do doador, ativando o sistema complemento e promovendo o processo de trombose intravascular, além da necrose da parede dos vasos (ABBAS, 2015).

Visando essas questões, diferentes grupos de pesquisa procuram aplicar metodologias de engenharia genética nos animais que poderiam ser funcionais para a captação de órgãos.

Um exemplo é o de Butler e colaboradores (2016) que realizaram a partir do complexo da CRISPR-Cas9 a deleção dos genes *GGTA1*, *CMAH* e *B4GalNT2*, relacionados com a expressão de carboidratos nas células suínas podendo atuar como antígenos e disparadores de sinalização a partir do seu contato com anticorpos pré-existentes em humanos. Além disso, também foi introduzido um transgene *hCRP*, que se refere a uma proteína reguladora do sistema complemento, com as células tratadas foi realizada a clonagem dos animais, que se desenvolveram e o grupo pode obter amostras de sangue venoso.

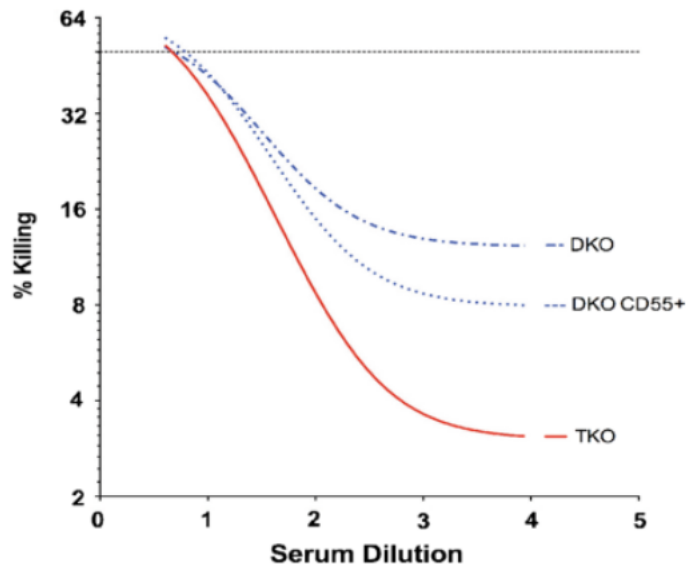
E então a partir de ensaios foram colocadas em contato as células suínas mononucleadas do sangue periférico modificadas conforme descrito na tabela 2, e soro humano coletado previamente de adultos saudáveis.

Tabela 2: Esquema de modificações realizadas por Butler et al. (2016) em células suínas.

Célula \ Gene	GGTA	CMAH	B4GalNT2	hCRP
DKO	-	-	sem alteração	sem alteração
DKO CD55+	-	-	sem alteração	+
TKO	-	-	-	sem alteração

Portanto foi possível analisar a partir de citometria de fluxo a viabilidade das células diante de diferentes alterações conforme apresentado no gráfico (figura 7) as células que tiveram apenas os genes *CMAH* e *GGTA* deletados (DKO) tiveram uma alta porcentagem de morte, assim como as células que apresentam o transgene *hCRP* (DKO CD55+). Enquanto as células que tiveram os genes *CMAH*, *GGTA* e *B4GalNT2* deletados (TKO) tiveram uma baixa taxa de morte celular (BUTLER et al., 2016).

Figura 7: Representação da análise de regressão não linear das curvas de morte obtidas a partir do ensaio em sete pontos de diluição.



Fonte: Butler et al., 2016.

Evidencia-se a necessidade de análise de uma possível sinergia entre a deleção dos três genes associados a expressão de antígenos, e a introdução do hCRP relacionada com a regulação do sistema complemento.

Além disso, existe outro importante fator que desde a década de 80 vem sendo relacionado com o disparo de mecanismos que levam a rejeição do enxerto, que se trata do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), esse, pode se apresentar em diferentes espécies, mas na maioria delas com semelhanças estruturais e funcionais (SNELL et al., 1980).

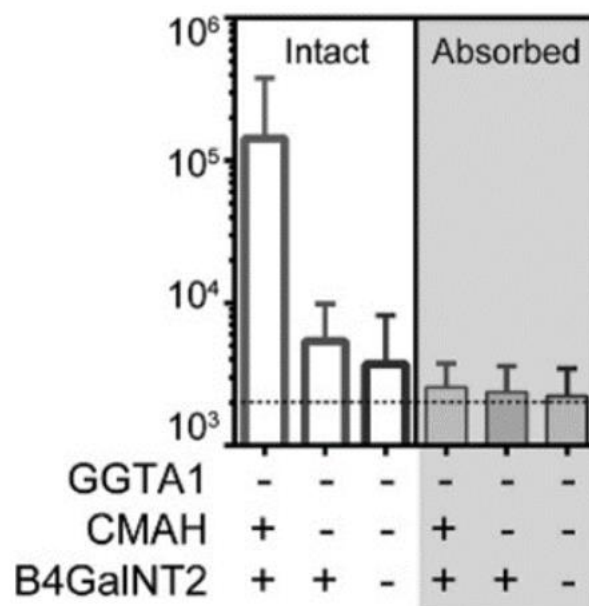
Com os conhecimentos das funções relacionadas ao MHC, e sua identificação no processo de rejeição, mesmo em aloenxertos, já que havia disparidades nos perfis do antígeno leucocitário humano (HLA), foi desenvolvida a hipótese de que em casos de xenotransplantes, o antígeno leucocitário suíno (SLA) poderia levar a uma situação de rejeição similar, devido as suas correspondências proteicas (MARTENS et al., 2017).

A partir disso, a técnica de CRISPR-Cas9 foi utilizada para silenciar os genes associados a expressão do SLA, para isso um grupo de estudo utilizou três gRNA para três sequências presentes no gene alvo, permitindo a formação de células que não apresentassem o perfil de SLA, algumas células poderiam apresentar transcritos, mas nenhuma proteína era traduzida. Essas células foram clonadas e suínos foram gerados, após esse processo foram coletadas células de fibroblastos e

mononucleadas do sangue periférico para verificação da presença do complexo SLA, e não apresentavam nenhum sinal relacionado ao grupo de genes. Ainda foi analisada uma inconsistência na proporcionalidade entre linfócitos CD4 e CD8, evidenciando um possível aumento no risco de infecções e processos neoplásicos, no entanto até o momento da publicação do artigo os animais estavam saudáveis e bem desenvolvidos com 14 semanas (REYES et al., 2014).

O estudo que desenvolveu a hipótese sobre as semelhanças entre HLA e SLA, também utilizou a metodologia da CRISPR-Cas9 para criar suínos deficientes em SLA, além de outros antígenos como *GGTA1*, *CMAH* e *B4GalNT2* os quais já foram abordados no presente trabalho. Nesse artigo foi analisado a função do SLA como antígeno semelhante a atividade do HLA no caso dos transplantes, de maneira que foi avaliada a reatividade dos anticorpos presentes em soro de pacientes na fila de transplante em contato com células suínas modificadas mononucleadas do sangue periférico, conforme figura 8 (MARTENS et al., 2017).

Figura 8: Análise da diferença da interação entre soro e células suínas pré e pós processo de retirada de anticorpos contra carboidratos.

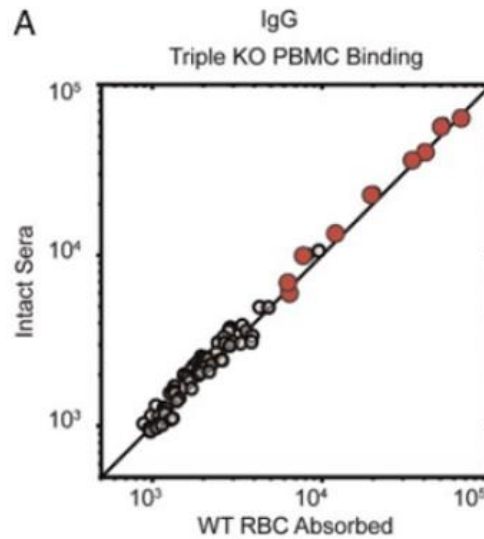


Fonte: Martens et al., 2017.

Com esses resultados o grupo expandiu a análise para uma quantidade maior de pacientes, mostrando a interação do soro pré e pós reação com as hemácias suínas. O que levou novamente a resultados interessantes para a situação (figura 9), em que há menor interação na maioria dos casos, no entanto existem os pontos vermelhos que representam uma interação significativa que persiste em aparecer o

que indica a possível presença de outras variantes que precisam ser analisadas e consideradas (MARTENS et al., 2017).

Figura 9: Análise de interação entre os soros de diferentes pacientes em contato com as células suínas modificadas mononucleadas do sangue periférico.



Fonte: Martens et al., 2017.

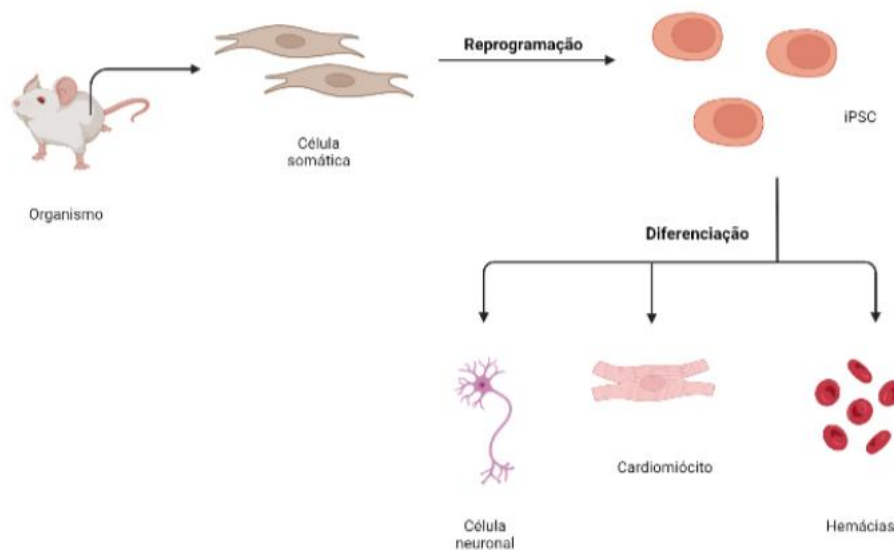
Desse modo, existe a identificação da relevância e semelhança do antígeno leucocitário suíno, e sua homologia com o antígeno leucocitário humano que já possui sua relevância no âmbito dos transplantes bem determinada. Conjuntamente é novamente evidenciada a necessidade contínua da análise de diferentes variáveis para cada paciente, o que se deve principalmente ao alto polimorfismo da região gênica associada ao MHC.

4.3 iPSC

Além das técnicas já abordadas, a urgência em se criar novos caminhos para suprir a necessidade de órgãos para transplante permitiu o surgimento da hipótese quanto ao uso das células tronco pluripotente induzidas (iPSC). As iPSC são células pluripotentes desenvolvidas a partir de células somáticas que podem ser reprogramadas em outros tipos celulares (TAKAHASHI et al., 2006).

Essas células são elaboradas a partir de métodos de reprogramação celular, no qual são introduzidos fatores de transcrição como Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc através de vetores virais, conforme esquema da figura 10 (TAKAHASHI et al., 2006), além disso posteriormente foi identificada a eficiência da administração de fatores de crescimento assim como componentes químicos auxiliando no rendimento da produção de células iPS (SHI et al., 2008).

Figura 10: Esquema da elaboração de iPSC.

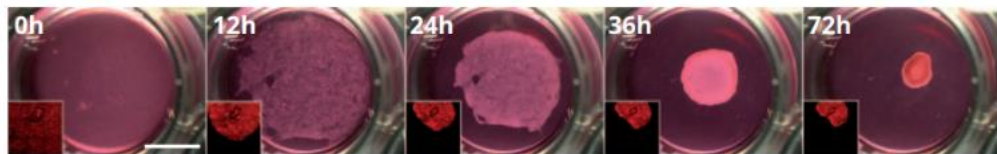


Sendo assim esses estudos permitiram que células, como fibroblastos fossem retirados do organismo e reprogramados para voltarem a se tornar células pluripotentes, com isso possibilitando a indução dessa iPSC se tornar outro tipo celular diferente do original. Permitindo analisarmos o mecanismo de doenças; a eficiência de novos tratamentos e ainda utilizarmos a própria iPSC como terapia (OHNUKI e TAKAHASHI, 2015).

Ademais, há a possibilidade dessa metodologia ser aplicada aos transplantes, no entanto existem poucos estudos que procuram avaliar a aplicação das iPSC nesse cenário. Dentre esses, um grupo de pesquisa japonês ainda em 2013 analisou a viabilidade de um transplante hepático realizado a partir de iPSC diferenciados em hepatócitos organizados em organoides.

No qual o grupo embasou-se no desenvolvimento embrionário hepático, e realizou uma preparação com células da endoderme hepática a partir de iPSC humanas por diferenciação, logo essas células foram cultivadas com outros tipos celulares sendo essas células estromais; células endoteliais da veia umbilical humana e células tronco mesenquimais humanas. Os iPSC hepáticos se auto-organizam em aglomerados formando estruturas tridimensionais, também denominadas de organoides, como pode ser observado na figura 11 (TAKEBE et al., 2013).

Figura 11: Desenvolvimento ao longo do tempo dos iPSC hepáticos.



Fonte: Takebe et al., 2013.

Com esse material foram realizadas análises para identificação dos genes pertencentes aquela amostra, e foi possível constatar o aumento na expressão de genes atrelados a atividade hepática, por exemplo a alfa feto proteína; transtirretina e albumina. Então transplantaram esse organoide associado ao fígado de ratos, sendo possível observar que o organismo do animal iniciou a formação de vasos que conduziam nutrientes e oxigênio, permitindo assim o seu desenvolvimento (TAKEBE et al., 2013).

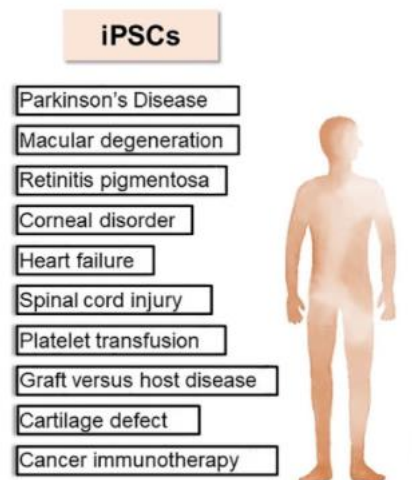
A partir desse processo foram realizadas análises histológicas seriadas, esses ensaios mostraram que as iPSC se proliferaram após o transplante. E foi constada a alta funcionalidade desse procedimento, uma das provas realizadas foi a partir da pesquisa quanto a atividade metabólica a substâncias exógenas, sendo administrado aos ratos um medicamento que conhecidamente são metabolizados hepaticamente, e de forma diferente entre ratos e humanos. Depois da exposição foi possível constatar a presença de metabólitos específicos para humanos em amostras de urina e soro dos animais transplantados (TAKEBE et al., 2013).

Portanto, a utilização de iPSC pode ser um importante fator a ser considerado para a urgência da escassez de órgãos disponíveis para transplante, mesmo que não seja capaz de substituir um órgão por completo, essa terapia pode ser importante para regeneração de uma estrutura.

Além do mais, as iPSC podem ser visualizadas como uma opção anterior a necessidade por um enxerto, pois comparada a carência de publicações no campo dos transplantes, existe uma ampla gama de artigos avaliando a aplicação de iPSC no tratamento de diversas doenças que podem levar a demanda de um transplante, como em lesões nas células cardíacas (ZHANG et al., 2009).

Ademais, em um cenário mais atual ainda existe um relevante interesse da aplicação da metodologia em doenças com distintas fisiopatologias, como por exemplo a aplicação na doença de Parkinson (SCHWEITZER et al., 2020); no tratamento de lesões da medula espinhal (GAO et al., 2020), dentre outras aplicações apresentada na figura 12.

Figura 12: Diferentes abordagens para aplicação de terapias a partir de iPSCs.



Fonte: Yamanaka, 2020.

No entanto, mesmo que seja formada uma grande expectativa quanto a aplicação das células pluripotentes induzidas, é importante ressaltar que ainda existem diversas barreiras e desafios atrelados ao uso da técnica (YAMANAKA, 2020). A título de exemplo o risco associado a tumorigenicidade, visto que serão aplicadas ao paciente células com alta capacidade de proliferação, podendo apresentar situações em que exista indiferenciação celular (MANDAI et al., 2017), ou até mesmo estar associada com variações genéticas decorrentes do processo de formação das iPSCs (AMPS et al., 2011).

Evidenciando de forma ainda mais expressiva a necessidade da continuação dos estudos na aplicação da técnica, e possíveis intercorrências associadas. Dado que é notória a capacidade da utilização de iPSCs em diferentes frentes, no entanto, existe pouca literatura mostrando sua utilização no contexto dos transplantes.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É evidente que os transplantes devem ser assistidos com maior diligência, visto que ao longo dos anos o número de pessoas na fila dos transplantes apenas aumenta, enquanto as cirurgias realizadas não conseguem acompanhar esse ritmo. Mesmo os pacientes que superaram as dificuldades relacionadas a falta de órgão e compatibilidade entre doador/receptor, ainda precisam ultrapassar as adversidades relacionadas a terapia imunossupressora por longos períodos.

Portanto trazer soluções biotecnológicas para os transplantes é extremamente significativo, ainda mais quando a partir dos resultados apresentados pode ser analisado que diferentes métodos podem ser aplicados de diferentes maneiras.

As técnicas apresentadas nesse trabalho, apresentam eficiência e aplicabilidade para controlar problemas relacionados a disponibilidade de órgãos para transplantes. Notoriamente que algumas técnicas possuem maior potencial que outras, principalmente quando analisamos a perspectiva temporal de aplicabilidade clínica.

Como o miRNA, que pode ser cogitado para aplicação a curto prazo, visto que possui um número elevado de resultados em diferentes aplicações, como por exemplo a utilização como biomarcador, controle da resposta inflamatória e até em sinergia com terapias que já existe um conhecimento mais profundo.

Enquanto técnicas como a CRISPR e IPSC, podem ser vislumbradas a um prazo mais longo, uma vez que existem maiores riscos associados a aplicação desses métodos, além do que existe uma evidente escassez de projetos aplicando o IPSC no cenário dos transplantes. E mesmo que para a CRISPR existam mais estudos, são muitas as variáveis que ainda não foram analisadas, podendo apresentar um risco ao paciente quando exposto a situações não testadas.

Além disso, também é importante avaliarmos o uso de todas as técnicas não somente de maneira singular, mas sim como algo sinérgico a aquilo que já temos conhecimento, nesse caso as terapias imunossupressoras.

Em suma, existem resultados extremamente positivos quanto ao uso de alguns métodos no cenário dos transplantes, ao mesmo tempo que ainda há muito o que ser testado e compreendido para aplicação clínica, além dos entraves econômicos, sociais e éticos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8ª Edição. Elsevier, 2015.

AMPS, Katherine *et al.* **Screening a large, ethnically diverse population of human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon that confers a growth advantage**. *Nat Biotechnol*, 2011. Disponível em: 10.1038/nbt.2051. Acesso em: 23 maio 2023.

BARTEL, David P. *et al.* **MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function**. Cell Press, 2004. Disponível em: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5. Acesso em: 12 abr. 2023.

BUTLER, James R. *et al.* **Silencing porcine genes significantly reduces human-anti-pig cytotoxicity profiles: an alternative to direct complement regulation**. Napa Valley: Transgenic Res, 2016. Disponível em: 10.1007/s11248-016-9958-0 Acesso em: 17 de maio 2023.

CHARPENTIER, Emmanuelle ; DOUDNA, Jennifer A . **Biotechnology: Rewriting a genome**. Hanover: Nature, 2013. Disponível em: 10.1038/495050a Acesso em: 14 de maio 2023.

CONDRAT, Carmen Elena *et al.* **MiRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis**. Bucareste: MDIP, 2020. Disponível em: 10.3390/cells9020276 Acesso em: 20 de mar. 2023.

COWAN, P. J. ; TECTOR, A. J.. **The Resurgence of Xenotransplantation**. Vitória: American Journal of Transplantation, 2017. Disponível em: 10.1111/ajt.14311 Acesso em: 12 de maio 2023.

DANGER, Richard *et al.* **Upregulation of miR-142-3p in peripheral blood mononuclear cells of operationally tolerant patients with a renal transplant**. Nantes: American Society of Nephrology, 2012. Disponível em: 10.1681/ASN.2011060543 Acesso em: 07 mar. 2023.

DELVES, P.; MARTIN,S.J; BURTON,D.R.; ROITT, I.M. **Fundamentos de Imunologia**. 12ª Edição - GUANABARA KOOGAN. 2013.

DENNER, Joachim *et al.* **How Active Are Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs)?**. Pensilvânia: Kidney International, 2016. Disponível em: 10.3390/v8080215 Acesso em: 16 de maio 2023.

DHARAP, Ashutosh. **MicroRNA miR-324-3p induces promoter-mediated expression of RelA gene**. Madison: PLOS ONE, 2013. v. 8. Disponível em: 10.1371/journal.pone.0079467 Acesso em: 09 mar. 2023.

DURAND, Justine; CHIFFOLEAU, Elise. **B cells with regulatory properties in transplantation tolerance**. Nantes: World Journal Transplantation, 2015. Disponível em: 10.5500/wjt.v5.i4.196 Acesso em: 07 mar. 2023.

GAJ, Thomas *et al.* **In vivo genome editing improves motor function and extends survival in a mouse model of ALS.** Berkeley: SCIENCE ADVANCES, 2017. Disponível em: 10.1126/sciadv.aar3952 Acesso em: 15 de maio 2023.

GAO, Liansheng *et al.* **Progress in Stem Cell Therapy for Spinal Cord Injury.** *Stem Cells International*, 2020. Disponível em: 10.1155/2020/2853650. Acesso em: 20 maio 2023.

HAFT, Daniel H. *et al.* **A Guild of 45 CRISPR-Associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes.** Maryland: The Institute for Genomic Research, 2005. Disponível em: 10.1371/journal.pcbi.0010060 Acesso em: 14 de maio 2023.

HAMDORF, Matthias *et al.* **The Potential of MicroRNAs as Novel Biomarkers for Transplant Rejection.** Londres: Journal of Immunology Research, 2017. Disponível em: 10.1155/2017/4072364 Acesso em: 11 mar. 2023.

HARDEN JT, KRAMS SM. **Micro-RNAs in transplant tolerance.** *Curr Opin Organ Transplant.* 2018 Feb;23(1):66-72. Acesso em: 11 mar. 2023.

HARRIS, Aleishia *et al.* **MicroRNAs as Immune Regulators: Implications for Transplantation.** Stanford: American Journal of Transplantation, 2010. Disponível em: 10.1111/j.1600-6143.2010.03032.x Acesso em: 09 mar. 2023.

JINEK, Martin *et al.* **RNA-programmed genome editing in human cells.** Berkeley: Planck Institute for Developmental Biology, 2013. Disponível em: 10.7554/eLife.00471 Acesso em: 15 de maio 2023.

KHAN, Zahraa *et al.* **MicroRNAs and Transplantation.** Nova Iorque: Clin Lab Med, 2019. Disponível em: 10.1016/j.cll.2018.10.003 Acesso em: 09 mar. 2023.

KOROBINSKI, CARLA PRISCILA *et al.* **Rejeição e compatibilidade hla.** *Revista Thêma et Scientia.* Vol 2, p. 120-125. 2012.

KNOTT, Gavin J. ; DOUDNA, Jennifer A. . **CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering.** Berkeley: Howard Hughes Medical Institute, 2018. Disponível em: 10.1126/science.aat5011 Acesso em: 14 de maio 2023.

LI, Jinzheng *et al.* **Knockdown of microRNA-155 in Kupffer cells results in immunosuppressive effects and prolongs survival of mouse liver allografts.** Londres: Transplantation, 2014. Disponível em: 10.1097/TP.0000000000000061 Acesso em: 12 mar. 2023.

LIMA, Jorge, *et al.* **MicroRNAs: entendendo seu papel como reguladores da expressão gênica e seu envolvimento no câncer.** São Paulo, 2021. Disponível em: 10.31744/einstein_journal/2021RB5996 Acesso em: 07 mar. 2023.

MACEDO, Luciana Conci; TIZO, Juliana Moura. **Principais complicações e efeitos colaterais pós-transplante renal.** Revista UNINGÁ Review, Vol 24, p. 62-70. 2015.

MANDAI, Michiko *et al.* **Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration.** The New England Journal of Medicine, 2017. Disponível em: 10.1056/NEJMc1706274. Acesso em: 22 maio 2023.

MARTENS, Gregory R. *et al.* **Humoral Reactivity of Renal Transplant-Waitlisted Patients to Cells From GGTA1/CMAH/B4GalNT2, and SLA Class I Knockout Pigs.** Original Basic Science General, 2017. Disponível em: 10.1097/TP.0000000000001646. Acesso em: 09 maio 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS. **Sistema Nacional de Transplantes.** Brasília: Conselho Federal de Medicina. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/saes/snt> Acesso em: 30 jul. 2023.

MOLINARI, Hugo Bruno Correa et al. **Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas.** Brasília: Embrapa, 2020.

MORELLI, Adrian E.; THOMSON, Angus W.. **Dendritic cells:: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction.** Immunological Reviews, 2007. Disponível em: 10.1046/j.1600-065x.2003.00079.x. Acesso em: 15 abr. 2023.

NAPIMOGA, MARCELO H. et all. **Ação dos linfócitos T regulatórios em transplantes.** Revista brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 30, p. 309-315. 2008.

NIU, Dong *et al.* **Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9.** Boston: HHS Public Access, 2017. Disponível em: 10.1126/science.aan4187 Acesso em: 16 de maio 2023.

O'BRIEN, Jacob *et al.* **Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation.** 9. ed. Toronto: Front. Endocrinol, 2018. v. 402. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402> Acesso em: 12 mar. 2023.

OHNUKI, Mari ; TAKAHASHI, Kazutoshi . **Present and future challenges of induced pluripotent stem cells.** São Francisco: The Royal Society, 2015. Disponível em: 10.1098/rstb.2014.0367 Acesso em: 18 de maio 2023.

REESE, Peter P *et al.* **Unique problems for the design of the first trials of transplanting porcine kidneys into humans.** Nova Iorque: International Society of Nephrology, 2022. Disponível em: 10.1016/j.kint.2022.10.009 Acesso em: 12 de maio 2023.

REYES, Luz M. *et al.* **Creating Class I MHC Null Pigs Using gRNA and the Cas9 Endonuclease.** J. Immunol, 2014. Disponível em: 10.4049/jimmunol.1402059. Acesso em: 10 maio 2023.

RIELLA, Leonardo. **Entendendo as causas da mortalidade pós transplante: Indo além do que se percebe à primeira vista.** Braz. J. Nephrol, 2018. Disponível em: 10.1590/2175-8239-JBN-2018-0002-0003. Acesso em: 18 jan. 2023.

RUPP, Levi J. *et al.* **CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells.** São Francisco: Scientific Reports, 2017. Disponível em: 10.1038/s41598-017-00462-8 Acesso em: 15 de maio 2023.

SALIMINEJAD, Kioomars *et al.* **An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods.** J Cell Physiol., 2018. Disponível em: 10.1002/jcp.27486. Acesso em: 12 abr. 2023.

SCHWEITZER, Jeffrey S. *et al.* **Personalized iPSC-Derived Dopamine Progenitor Cells for Parkinson's Disease.** N Engl J Med., 2020. Disponível em: 10.1056/NEJMoa1915872. Acesso em: 20 maio 2023.

SHI, Yan *et al.* **Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds.** California: Cell Stem Cell, 2008. Disponível: 10.1016/j.stem.2008.10.004 Acesso em: 18 de maio 2023.

SNELL, George D.. **STUDIES IN HISTOCOMPATIBILITY.** Maine: The Jackson Laboratory, 1980.

SONG, Jiangping *et al.* **Micro RNA-98 suppresses interleukin-10 in peripheral B cells in patient post-cardio transplantation.** Beijing: Oncotarget, 2017. Disponível em: 10.18632/oncotarget.16000 Acesso em: 12 mar. 2023.

Stevens S. **Synthetic Biology in Cell and Organ Transplantation.** Cold Spring Harb Perspect Biol. 2017.

SUN, Yong *et al.* **MicroRNA let-7i regulates dendritic cells maturation targeting interleukin-10 via the Janus kinase 1-signal transducer and activator of transcription 3 signal pathway subsequently induces prolonged cardiac allograft survival in rats.** Amsterdã: Elsevier, 2016. Disponível em: 10.1016/j.healun.2015.10.041 Acesso em: 11 mar. 2023.

TAKAHASHI, Kazutoshi ; YAMANAKA, Shinya. **Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors.** Kyoto: Elsevier Inc, 2006. Disponível em: 10.1016/j.cell.2006.07.024 Acesso em: 17 de maio 2023.

TAKEBE, Takanori *et al.* **Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant.** Japão: Macmillan Publishers Limited, 2013. Disponível em: 10.1038/nature12271 Acesso em: 19 de maio 2023.

WANG, Ting . **MicroRNA-122 ameliorates corneal allograft rejection through the downregulation of its target CPEB1.** Republic of China: Official journal of the Cell

Death Differentiation Association, 2017. Disponível em: 10.1038/cddiscovery.2017.21 Acesso em: 12 mar. 2023.

WEI, Liang *et al.* **Absence of miR-182 Augments Cardiac Allograft Survival.** Stanford: Transplantation, 2017. Disponível em: 10.1097/TP.0000000000001345. Acesso em: 11 mar. 2023.

WEI, Wei *et al.* **MicroRNA-1 and microRNA-499 downregulate the expression of the ets1 proto-oncogene in HepG2 cells.** Londres: Oncology Reports, 2012. v. 28. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/or.2012.1850> Acesso em: 10 mar. 2023.

WELMAN T, Michel S, SEGAREN N, SHANMUGARAJAH K. Bioengineering for Organ Transplantation: Progress and Challenges. Bioengineered, 2015. Disponível em: 10.1080/21655979.2015.1081320. Acesso: 26 jan. 2023.

YAMANAKA, Shinya. **Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy - Promise and Challenges.** Cell Stem Cell, 2020. Disponível em: 10.1016/j.stem.2020.09.014. Acesso em: 19 maio 2023.

ZHANG, Jianhua *et al.* **Functional Cardiomyocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells.** Madison: Cellular Dynamics International, 2009. Disponível em: 10.1161/CIRCRESAHA.108.192237 Acesso em: 19 de maio 2023.

ZUO, Erwei *et al.* **CRISPR/Cas9-mediated targeted chromosome elimination.** Shanghai: Genome Biology, 2017. Disponível em: 10.1186/s13059-017-1354-4 Acesso em: 15 de maio 2023.