

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Letícia Dias Thomaz

**TÉCNICAS DE EDIÇÃO DE GENOMA: SISTEMA
CRISPR-CAS9 E A TERAPIA GÊNICA**

São Paulo
2018

Letícia Dias Thomaz: 000458

**TÉCNICAS DE EDIÇÃO DE GENOMA: SISTEMA
CRISPR-CAS9 E A TERAPIA GÊNICA**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado para o curso de Biomedicina
do Centro Universitário São Camilo,
orientado pelo professor Doutor Fábio
Mitsuo Lima, como requisito parcial para
a obtenção do título em Bacharel em
Biomedicina.

São Paulo

2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Thomaz, Letícia Dias

Técnicas de edição de genoma: sistema / Letícia Dias Thomaz. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2018.
71 p.

Orientação de Fábio Mitsuo Lima

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2018.

1. Genética 2. Genoma 3. Nucleases dos efetores semelhantes a ativadores de transcrição 4. Quebras de DNA de cadeia dupla 5. Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas I. Lima, Fábio Mitsuo II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 575.1



Letícia Dias Thomaz

**TÉCNICAS DE EDIÇÃO DE GENOMA: SISTEMA CRISPR-
CAS9 E A TERAPIA GÊNICA**

São Paulo, 25 de Maio de 2018

Professor Orientador – Prof.^o Dr.^o Fábio Mitsuo Lima

Professor Examinador – Prof.^a Dr.^a Beatriz Helena Pizarro de Lorenzo

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu marido que sempre me apoiou e incentivou durante toda a graduação e ao longo deste trabalho. Sem ele nada disso seria possível. Dedico também às minhas duas tias queridas Cimone e Zenilda, que além de serem como uma segunda mãe, sempre me impulsionaram a estudar e a ser independente. A todos meus amigos que sempre me deram dicas de como desenvolver este trabalho, mas principalmente para a Karen Natsumi, minha colega de curso, que sempre me ajudou durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente ao meu orientador que esteve disposto a me ajudar ao longo do desenvolvimento deste trabalho, além de em sala de aula me inspirar e me direcionar para o tema que escolhi. Agradeço também todos os professores do curso de biomedicina que são excelentes docentes.

THOMAZ, L.D. **Técnicas de edição de genoma**: sistema CRISPR-Cas9 e a terapia gênica. 2018, 66f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biomedicina), Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2018.

O CRISPR é um mecanismo de defesa de bactérias contra DNAs invasores. Quando de sua descoberta, pouco se sabia sobre o seu envolvimento com a imunidade bacteriana e, com o passar dos anos, diversos trabalhos caracterizaram a técnica. O CRISPR tipo II é o mais usado. As bactérias copiam fragmentos de DNA invasor para o *loci* do CRISPR e usa a maquinaria do CRISPR para formar uma dupla quebra no DNA e inativar invasores. A aplicação do CRISPR-Cas9 na genética médica melhorou tratamentos de doenças genéticas e virais e tem sido usado na edição genética tanto em animais quanto em células humanas. O uso em células humanas abriu o debate ético e discute a importância da imposição de limites no seu uso para o benefício da sociedade, levando em conta os efeitos de seu uso a longo prazo e a sua irreversibilidade. Além da preocupação com aumento do preço dos tratamentos que poderá não estar disponível para todas as camadas sociais. Buscou-se aqui descrever a técnica e seu uso na terapia gênica com seus prós e contras usando a pesquisa bibliográfica em diversos livros e artigos acadêmicos. Por fim a técnica tem o potencial de ajudar a melhorar e a desenvolver novos tratamentos para diversas doenças genéticas ou virais e é bastante importante para pesquisa básica e clínica.

Palavras chaves: Genética. Genoma. Nucleases dos efetores semelhantes a ativadores de transcrição. Quebras de DNA de cadeia dupla. Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas.

THOMAZ, L.D. **Genome editing techniques: CRISPR-Cas9 system and gene therapy.** 2018, 66f. Final paper (Graduation in Biomedicina), Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2018.

CRISPR is a mechanism of defense of bacteria against invaders DNA. When the mechanism was discovered little was known about its involvement with bacterial immunity and over the years several works characterized the technique. The CRISPR type II is the most used. Bacteria copy the invader DNA fragments into the CRISPR loci and uses the CRISPR machinery to perform a double stranded break in DNA, inactivating invaders. The application of CRISPR-Cas9 in medical genetics has improved treatments of genetic and viral diseases and has been used in genetic editing in animals and human cells successfully. The use in human cells has opened the ethical debate and discusses the importance of imposing limits on its use for the benefit of society, taking into account the effects of its long-term use and its irreversibility. In addition to the concern with increased price of treatments that may not be available for all social layers. This work sought to describe the technique and its use in gene therapy with its pros and cons using bibliographic research in several books and academic articles. Finally the technique has the potential to help improve and develop new treatments for various genetic or viral diseases and it is quite important for basic and clinical research.

Key Words: Genetic. Genoma. Transcription Activator-Like Effector Nucleases. Double stranded break. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats.

Lista de Abreviaturas

A Adenosina

AAV Adeno-associated virus

ADA-SCID Imunodeficiência severa combinada-deficiência de adenosine deaminase

AMPc Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

Asn Asparagina

Asp Ácido aspártico

C citosina

CCR5 recetor quimiocina tipo 5

CFTR regulador de condutância transmembranar de fibrose cística

CPP Peptídeo de penetração celular

CRISPR Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

crRNA CRISPR RNA

Cys Cisteína

DeCs Descritores em Ciências da Saúde

DNA Ácido Desoxirribonucleico

DOPE 1,2-dioleoil-fosfatidil-etanolamina

DSB Double stranded breaks

dsDNA Double Strand

EGFP Proteína verde fluorescente

EMG Elementos genéticos móveis

FAH Fumarilacetato hidrolase

FDA Food and Drug Administration

G Guanina

Gly Glicina

HBV Vírus da Hepatite B

HDR Homology directed repair

His Histidina

HIV Vírus da imunodeficiência humana

HPSCs Células tronco humanas pluripotentes

HPV Vírus do papiloma humano

Ile Isoleucina

Indels Inserções ou deleções

iPSCs células estaminais induzidas a partir de fibroblastos humanos

LDL Proteína carregadora de lipídios de baixa densidade

NHEJ Non-homologous end joining

PAM Protospacer adjacent *motif*

PCSK9 Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9

RISCs RNA-induced silencing complexes

RNAm RNA mensageiro

RNP Ribonucleoproteínas

RVD Repeat variable di-residue

SgRNA Single guided RNA

siRNA RNA de interferência

SRSRs Short Regularly Spaced Repeats

T Timina

TALEN Transcription Activator-Like Effector Nucleases

tracrRNA - trans-activating CRISPR RNA

TREPs Tandem repeats

WAS Síndrome Wiscott-Aldrich

X-CGD Doença granulomatosa crônica ligada ao X

X-SCID Imunodeficiência severa combinada-deficiência de IL2RG

ZFN Zinc Finger Nucleases

ZIKV Zika Vírus

Lista de figuras

Figura 1.1 – Fases do funcionamento do CRISPR-Cas9 em bactérias.....	16
Figura 1.2 - Estrutura da nuclease dedo de zinco (ZFN).....	23
Figura 2 - TALEN e os sistemas de Reparação de DNA.....	25
Figura 3 - Vantagens e desvantagens dos sistemas atuais de edição de genoma.....	27
Figura 4 - Matriz e sequência líder.....	34
Figura 5 – Variantes do Cas9.....	36
Figura 6 – Single guide RNA e PAM.....	38
Figura 7 – Funcionamento do CRISPR-Cas e a formação da quebra na dupla fita do DNA.....	39
Figura 8 - Mecanismos de reparo do DNA por NHEJ e HDR.....	41
Figura 9 - Mecanismos de reparação do DNA NHEJ e HDR (com vias).....	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVO.....	17
3 METODOLOGIA.....	18
4 DESENVOLVIMENTO.....	19
4.1 Ética.....	19
4.2 Ferramentas de edição de genoma.....	22
4.3 História do CRISPR.....	28
4.4 O CRISPR e o seu funcionamento.....	32
4.5 Componentes do CRISPR.....	34
4.5.1 Matriz.....	34
4.5.2 Sequência líder.....	34
4.5.3 Cas9.....	35
4.5.4 Nickases Cas9/ variantes da Cas9.....	35
4.5.5 sgRNA.....	37
4.6 Funcionamento do CRISPR-Cas9.....	38
4.6.1 Mecanismos de reparo na clivagem pelo CRISPR-Cas9.....	39
4.6.2 Efeito off-target.....	42
4.6.3 Entrega do CRISPR-Cas9 às células.....	43
4.6.4 Plasmídeos.....	44
4.6.5 Vetores virais.....	45
4.6.6 Lipofecção.....	45

4.6.7 Ribonucleoproteínas (RNPs).....	46
4.6.8 Peptídeo de penetração celular (CPP).....	47
4.7 Terapia gênica.....	48
4.8 Aplicações do CRISPR-Cas9 na terapia gênica.....	50
4.9 Outras aplicações do CRISPR-Cas9.....	56
4.9.1 Interferência e ativação por CRISPR.....	57
4.9.2 Correção de mutações de uma única base.....	57
4.9.3 Localização in situ por CRISPR.....	57
4.9.4 Aumento da transcrição genética por CRISPR.....	57
4.9.5 Evitar tradução do RNAm.....	58
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

O sistema CRISPR é um mecanismo de defesa das bactérias contra DNAs externos e consiste numa sequência de DNA que se repete, intercalado por sequências altamente variáveis chamadas de espaçadores. Este sistema é originalmente chamado de Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) (AL-ATTAR et al., 2011). Essas sequências palindrômicas foram primeiramente descritas pelo grupo de Mojica (2000) e a elas foi dado o nome de SRSRs (Short Regularly Spaced Repeats. Mais tarde o grupo de Jansen (2002) o renomeou para CRISPR, porém ainda não se sabia sua função. Mais tarde o grupo de Barrangou (2007) demonstrou experimentalmente a ligação entre o sistema CRISPR e a imunidade bacteriana.

Existem três tipos de CRISPR: I, II e III, sendo o tipo II o mais usado, também conhecido como CRISPR-Cas9 que age em conjunto com a endonuclease Cas9 (NABAIS, 2015). As bactérias são capazes de se defender de invasores copiando um segmento de aproximadamente vinte pares de bases do DNA invasor para um local do genoma do hospedeiro por meio de repetições palindrômicas curtas espaçadas entre si (NABAIS, 2015).

De acordo com NABAIS (2015) e WEISS; SAMPSON (2014) o CRISPR-Cas9 é composto pela endonuclease Cas9, duas moléculas de RNA curtas; crRNA (CRISPR RNA) e tracrRNA (*trans-activating* CRISPR RNA), assim como uma RNase III para maturar os crRNAs, cuja função é orientar a endonuclease Cas9 para o DNA alvo. O sistema funciona da seguinte forma: **Adaptação** - o DNA é encontrado pela maquinaria do sistema e um fragmento curto do invasor é incorporado à matriz deste sistema; **Expressão** - a matriz é transcrita e a transcrição é processada pela Cas; **Interferência** - os ácidos nucleicos do invasor são reconhecidos por complementaridade pelo crRNA neutralizando-os (Fig. 1). Os crRNA emparelha com os tracrRNA específicos da sequência, orientando as Cas9 para certos “*protospacers*” localizados no DNA alvo, conseguindo assim o seu silenciamento (NABAIS, 2015). Em suma, o complexo é capaz de reconhecer e clivar ácidos nucleicos complementares ao crRNA com o auxílio das endonucleases Cas9 (SHAFIE et al., 2014).

Segundo NABAIS (2015) crRNA são RNAs que foram submetidos a um ou dois eventos de processamento originando uma cadeia curta de RNA obtida a partir da transcrição de pequenos segmentos de DNA exógeno, interligados entre si dentro do *loci* genômico do CRISPR (AL-ATTAR et al., 2011) que pode ser usado em todos os tipos de CRISPR. O tracrRNA atua como um ativador necessário para processar todo o crRNA para o CRISPR tipo II e é um fator importante na função reguladora da expressão em genes endógenos (NABAIS, 2015). Já a Cas9 é uma DNA nuclease guiada por RNA capaz de introduzir mutações sítio dirigidas para perda de função de locais específicos no genoma, gerando quebras duplas nas fitas de DNA de *loci* genômicos específicos (SHAFIE et al., 2014).

A aplicação desse mecanismo bacteriano em genética médica abriu a possibilidade de aprimorar o tratamento de doenças genéticas e virais tais como o HIV, HBV, HPV, fibrose cística, entre outras (NABAIS, 2015). A tecnologia de edição de genoma é uma ferramenta nova usada para introduzir modificações dirigidas no genoma. Atualmente existem três tecnologias sendo usadas para este fim: nucleases dedo de zinco (ZFNs), nucleases efetoras semelhantes a ativador de transcrição (TALENs) e Repetições de palíndromos regularmente intercaladas em grupos (CRISPR). Os domínios de ligação local específicos do DNA dos sistemas ZFN e TALEN tem como base o uso de proteínas quiméricas, enquanto que o CRISPR usa moléculas de RNA (SHAFIE et al., 2014).

Para terapia gênica usando o sistema CRISPR-Cas9 precisamos de um RNA guia – sgRNA, composto por uma sequência de vinte nucleotídeos capaz de dirigir especificamente a proteína Cas9 para o seu destino, contendo um crRNA e um tracrRNA parcialmente complementares (SHAFIE et al., 2014). É um sistema de fácil desenho, altamente específico, eficiente e adequado para produção em larga escala de edição múltipla de genes para uma grande gama de organismos vivos e diferentes tipos celulares (SHAFIE et al., 2014).

O espaçador é composto por 20 nucleotídeos localizados na extremidade final 5' do sgRNA que direciona a enzima Cas9 para os 20 nucleotídeos complementares da sequência alvo e então estes hibridizam. O PAM (proto espaçador adjacente *motif*) precisa ser reconhecido pelo complexo Cas9 antes

que haja a quebra pela mesma. O PAM é uma estrutura secundária altamente conservada composta por poucos nucleotídeos que fica à frente do espaçador (SHAFIE et al., 2014). Para aplicação deste sistema como um editor de genoma, existe a necessidade de criar endonucleases que sejam extremamente eficientes e que façam quebras (*Double stranded breaks* - DSB) específicas na dupla fita de DNA, em locais definidos pelo pesquisador e que posteriormente ative as vias celulares envolvidas nos processos de reparo de DSB que podem ser: via recombinação homóloga (HDR - Homology directed repair) mediada por genes reparadores ou via junção de extremidade não homóloga (NHEJ - Non-homologous end joining). HDR usa uma fita de DNA invasora e requer um molde de DNA homólogo para editar precisamente uma sequência genômica ou inserir DNA exógeno, resultando no silenciamento ou não de genes. Enquanto que o sistema de reparação NHEJ é um processo de ligação propenso a erros que resulta em pequenas inserções ou deleções (mutação do tipo indel), envolvendo a religação das duas extremidades que foram rompidos nos respectivos locais de clivagem, e é um processo catalisado por DNA ligases. A formação de indels é explorada como um método conveniente para silenciar genes (desligamento de genes). Em suma, o sistema CRISPR-Cas9 é altamente capaz de modificar o alvo cromossômico através de mutações indel, permitindo simultâneas edições de várias sequências de DNA através da edição múltipla de genes tendo o potencial de substituí-los, pois visa simultaneamente as sequências que flanqueiam um determinado locus gênico (SHAFIE et al., 2014).

Segundo SHAFIE et al., foram feitos experimentos usando o sistema CRISPR em diversos modelos biológicos. Dentre eles, uma cepa de *Toxoplasma gondii*, cujo o gene que codifica a proteína serina treonina quinase ROP18 foi desligado (SHEN et al., 2014). Num peixe-zebra, foi reportada alta taxa de eficiência na mutagênese (75-99%), testando a perda de função de múltiplos fenótipos no mesmo peixe (5 *loci* genômicos) resultando em várias inativações bi alélicas (JAO et al., 2013). Foi feita também uma interrupção simultânea de 5 genes em células tronco de rato. Além disso foi feita uma co-injeção de RNAm para Cas9 e sgRNA mirando os genes Tet1 e Tet2 em zigotos, gerando ratos com mutações bi alélicas em ambos os genes com uma eficiência de 80%, demonstrando que o sistema é altamente eficiente em mirar em múltiplos genes

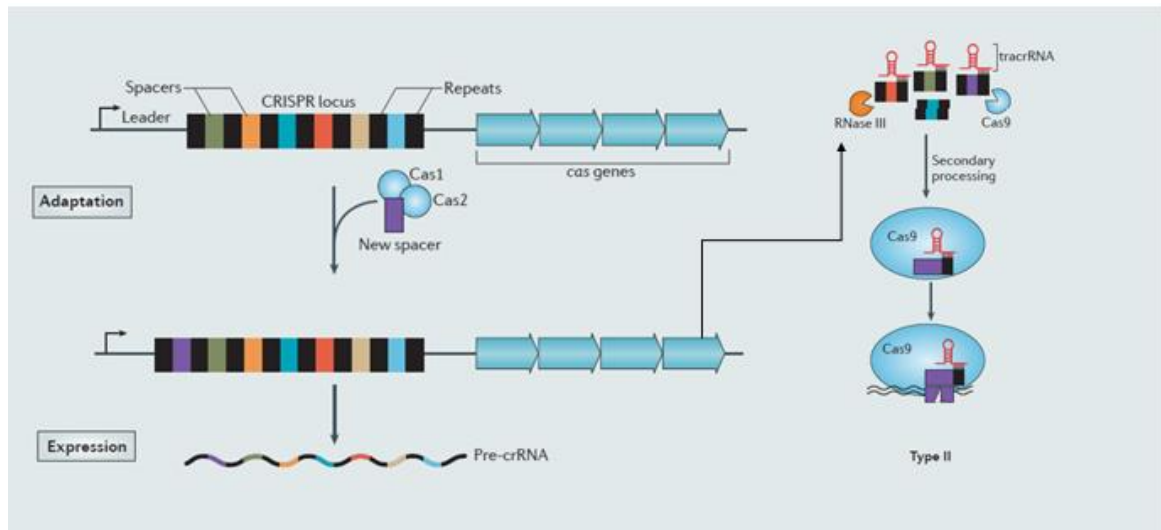
tanto em células tronco quanto em ratos (WANG et al., 2013). O sistema CRISPR-Cas9 também tem sido usado para gerar linhagem de células humanas desligadas (endometriais, células leucêmicas mielóides e células de melanoma) para rastreio genético, sugerindo que este sistema também pode ser usado para complementar os modelos de desligamento de genes em ratos, oferecendo uma nova estratégia para investigar a função dos genes em diferentes tipos celulares e tecidos (MA et al., 2014). O complexo induziu eficientemente mutações no gene *Prkdc* de ratos em mais de 93% dos recém-nascidos com um mínimo de toxicidade, o que sugere que o objetivo de mutagênese mediada em modelo animal foi alcançado (SUNG et al., 2014). Com o CRISPR-Cas9 também foi possível corrigir uma mutação em ratos no gene *Crygc* que causa cataratas coinjectando o RNAm da Cas9 juntamente do sgRNA tendo como alvo o gene *Crygc* obtendo poucas mutações off-target (WU et al., 2013). Por fim o grupo de Bassett (2013) conseguiu induzir mutações em *Drosophila melanogaster* (mosca de fruta) usando o CRISPR com uma eficiência de 88%. As mutações foram induzidas injetando sgRNA nos embriões das moscas.

Por sua vez a terapia gênica em humanos usando o sistema CRISPR-Cas9 foi feita e conseguiu-se corrigir mutações que levam a doenças, como em células de pacientes com beta-talassemia, através da correção de células tronco pluripotentes que restaurou a função normal e proporcionou uma fonte rica de células para transplante (SHAFIE et al., 2014). Há uma grande promessa desta tecnologia no uso contra o vírus HIV, que pode ser capaz de interromper o pró vírus e erradicar o genoma viral em indivíduos infectados através da edição do genoma viral (tendo como alvo o gene LTR no vírus, um promotor e também responsável pelo aumento da sua atividade do vírus) promovendo o bloqueio da expressão do material genético do vírus (EBINA et al., 2013). ZHEN et al. (2014) recentemente demonstraram bons resultados usando o sistema e tendo como alvo o promotor de oncogenes E6 e E7 do Papiloma vírus humano, resultando num acúmulo da proteína p53 e p21 e obtendo claramente a supressão da proliferação de células cervicais cancerosas *in vitro* e *in vivo*.

O grupo de Schwank (2013) obteve sucesso ao corrigir, *in vitro*, o gene CFTR (responsável pelo funcionamento do regulador de condutância transmembranar de fibrose cística (CFTR) que em condições normais se abrem quando há

aumento do AMPc, o que não ocorre em pacientes com a doença) em células tronco da mucosa intestinal de pacientes com fibrose cística que depois foram transformadas em células epiteliais organoides.

Figura 1 – Fases do funcionamento do CRISPR-Cas9 em bactérias



Modificado de (WESTRA; BUCKLING; FINERAN, 2014)

2 OBJETIVO

Descrever as técnicas envolvidas na edição de genoma: Sistema CRISPR-Cas9 e terapia gênica, visando cobrir todos os aspectos positivos e negativos envolvidos o tema, discutir as questões éticas inerentes a ela e explorar os diversos tipos de doenças que podem ser tratadas por meio desta ferramenta.

3 METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado por meio de pesquisa bibliográfica em livros de Microbiologia, Bioética, Biologia Molecular e Engenharia Genética da Biblioteca Padre Inocente Radrizzani, artigos, periódicos e teses acadêmicas nas bases de dados, bibliotecas eletrônicas e ferramentas de buscas acadêmicas, tais como: Scielo, PubMed, LILACS, BIREME, Medline e Google Acadêmico usando os seguintes descritores: *CRISPR-Cas9*, *CRISPR*, *Cas9*, *NHEJ*, *HDR*, *ethic CRISPR*, *delivery CRISPR-Cas9*, *gene therapy*, *genetic therapy*, *ZFN*, *TALENs*, *edição de genoma*, *terapia gênica*, *CRISPR-Cas9 gene therapy*.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 Ética

Não há somente pontos positivos nesta ferramenta, conforme BASTIDA (2016), ela tem um grande potencial de aplicação na correção de pequenas mutações no embrião podendo reverter o genótipo selvagem ligado a uma doença, porém uma outra escola de pensamento poderia considerá-la uma violação da ordem natural da vida, devendo ser usada apenas para corrigir um fenótipo que comprometa seriamente a saúde de um indivíduo que irá se desenvolver. Já segundo GOLDIM (2015), as reflexões bioéticas são importantes nesta era técnico-científica, especialmente quando uma nova tecnologia é introduzida e aplicada à pesquisa genética sem maiores estudos sobre os problemas éticos e sociais inerentes à ela. A chave para essa discussão é a irreversibilidade das ações envolvendo a introdução de novos aspectos no grupo de genes que são trazidos pela edição de genoma. Uma dessas técnicas é o CRISPR e, desde a sua introdução em 2002, até o momento presente, mais de 1300 artigos foram publicados e poucos falavam sobre a ética envolvida ao uso da técnica.

De acordo com BIOTEC (2016), com a possibilidade da alteração do genoma com o CRISPR surgem questões éticas, principalmente quanto à modificação do genoma humano. O National Institutes of Health informou que eles continuariam a financiar estudos científicos envolvendo edição genômica desde que essa técnica não fosse usada em embriões humanos. Em dezembro de 2015, foi realizado um encontro internacional para discutir o uso de ferramentas de edição genômica e, após 3 dias de debates, eles chegaram a uma conclusão: pesquisas básicas e pré-clínicas podem continuar desde que sujeitas a aprovação de comitês, e embriões ou células germinativas que tiverem seus genes editados não deverão ser usados para gravidez. O problema ético está relacionado ao tipo de células que será modificado, pois células germinativas e embriões podem ser editados para corrigir uma mutação e como resultado teríamos um organismo com essa alteração presente em todas as suas células, inclusive nas células germinativas que poderão ser herdadas por seus

descentes. Se essas alterações fossem somente para corrigir doenças, provavelmente, todos concordariam com o seu uso, porém esta mesma técnica poderia ser usada para modificar características físicas e aumentar as capacidades humanas, o chamado desenho de bebês. Portanto, surgem os questionamentos éticos, tais como: quem determina quais genes podem ser modificados? Que vantagem ou desvantagens essas alterações darão para estes indivíduos e como isso afeta toda a sociedade? Por isso é importante a discussão sobre as consequências do uso dessas tecnologias, que, infelizmente, podem se tornar vilãs se não houver limites bem desenhados.

A continuação das pesquisadas é importante, pois ainda pouco sabe-se sobre como essas ferramentas funcionam, sobre a sua segurança e sobre o seu real potencial. Não se pode simplesmente barrar o uso dessas tecnologias, pois iríamos abandonar uma ferramenta que poderia ajudar muitas pessoas que enfrentam as mais diversas doenças (BIOTEC, 2016).

Caplan et al. (2015) afirmam que, com a rápida aplicação do CRISPR-Cas9 na pesquisa clínica, torna-se importante considerar as implicações éticas desses avanços. Alguns problemas pertinentes incluem acessibilidade e custos, necessidade de estudos clínicos controlados com revisão adequada e políticas para uso compassivo. Os custos para terapias celulares por si só já são altos e tendem a aumentar ainda mais somando o CRISPR-Cas9 a eles, tornando essas terapias indisponíveis para aqueles com meios financeiros médios e com convênio médico, sem contar aqueles que não possuem estas condições financeiras e dependem exclusivamente de políticas públicas de saúde.

As políticas europeias e corporativas fornecem alguma orientação sobre quando e como permitir o uso compassivo ou ampliar o acesso a tratamentos experimentais, mas estes ainda precisam ser adaptados para abordar a edição de genes.

Conforme temos visto com terapias de células estaminais, há sempre aqueles dispostos a promover a desinformação ou exagerar, a fim de lucrar com os pacientes desesperados e suas famílias. Portanto garantir que o CRISPR-Cas não seja tratado como a cura para todas as doenças genéticas é crucial para a aplicação e divulgação adequada desta tecnologia. Ainda segundo Caplan et al. (2015) muito mais preocupante, atualmente, é a aplicação emergente de CRISPR aos organismos não-humanos. A capacidade de projetar

organismos geneticamente modificados com características desejadas com a tecnologia do CRISPR pode incentivar o desenvolvimento sem mecanismos de contenção suficientes, ou resultar na liberação ambiental prematura desses organismos e perda de controle sobre sua propagação. A facilidade e eficiência dele levanta a preocupação de que qualquer pessoa com o equipamento adequado poderia projetar um vírus da gripe vacina-resistente ou espécies invasoras em um laboratório clandestino podendo usá-lo para fins terríveis, como o bioterrorismo ou bioguerra.

Embora a nova tecnologia tenha trazido um importante debate sobre a possibilidade de proceder com a engenharia da linha germinal humana, os riscos das aplicações em outros organismos vivos devem servir como uma chamada para discutir a regulamentação nacional e internacional de diretrizes para o uso do CRISPR como ferramenta de edição genômica.

Em suma, a técnica representa um grande avanço científico para toda a comunidade, porém deve-se agir com cautela no que será desenvolvido com ela, uma vez que o uso desta ferramenta implica em alterações que podem ser permanentes e perigosas para a saúde da população a curto e longo prazo.

4.2 Ferramentas de edição de genoma

A primeira ferramenta conhecida na edição de genoma de eucariotos é a *Zinc Finger Nuclease* (ZFN), também chamada de nucleasse dedo de zinco. ZFN são enzimas que se ligam ao DNA dupla fita alvo e o cortam. Uma ZFN funcional é composta de duas proteínas individuais monoméricas, que se ligam em DNA dupla fita de até 15-18 nucleotídeos. Quando dois monômeros de ZFN estão sob a sequência alvo, os domínios de clivagem de DNA da Zinc finger dimerizam e criam uma quebra de dupla fita (HANSEN et al., 2012).

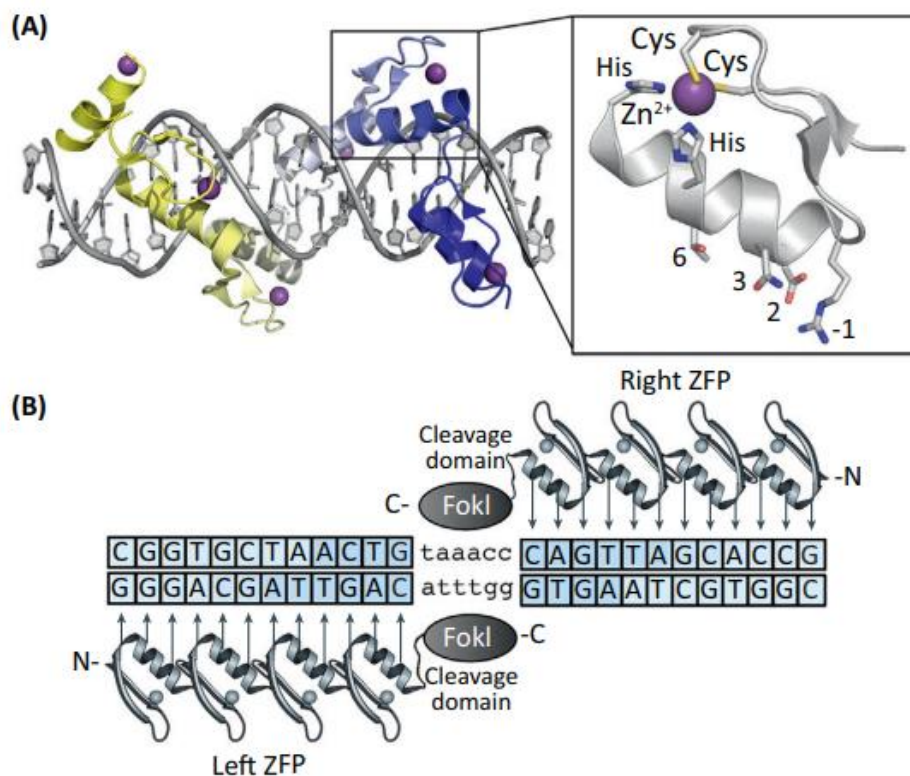
São proteínas planejadas para reconhecer sequências alvo de nucleotídeos no DNA, fazendo a mutagênese sítio dirigida. Seu domínio funcional é constituído por cerca de 30 resíduos de aminoácidos, formando arranjos modulares de três a sete domínios Zinc Finger (ZF) que se estabilizam estruturalmente fazendo pelo menos uma ligação com o átomo de zinco. Os domínios ZF ligam-se aos outros por meio de uma região conservada de aminoácidos chamada de TGEKP. Os domínios ZF possuem estruturas secundárias em alfa-hélice e duas fitas beta ($\beta\beta\alpha$), que se unem pelo átomo de Zinco, formando uma estrutura tridimensional tetraédrica que se assemelha a um dedo, dando este nome a elas (Fig. 1.1A). Dois ou mais domínios ZF se ligam a nucleases FokI por um peptídeo flexível. A enzima de restrição FokI tem atividade catalítica apenas quando dimerizada, por isso a necessidade da sua ligação com o domínio ZF. Para o seu funcionamento, é necessário um par de ZFNs, que se ligam de modo invertido e em cadeias opostas no DNA clivando-o e gerando DSBs (Fig. 1.1B) (VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2016).

Proteínas com múltiplos dedo de zinco ligados aumentam o tamanho do local de ligação e reconhecimento do DNA, bem como pequenas alterações nos aminoácidos das cadeias laterais da α hélice que fazem contato com o DNA alteram a especificidade das mesmas (VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2016). A produção de DSBs ativa os mecanismos de reparo do DNA lesado com a ajuda de sistemas NHEJ ou HDR.

Figura 1.1 - Estrutura da nuclease dedo de zinco (ZFN):

(A) Proteína de zinco formando um complexo com o DNA alvo (cinza). Resíduos superficiais (-1, 2, 3 e 6) que estão em contato com o DNA são mostrados em bastões. Cada domínio dedo de zinco entra em contato com 3 ou 4 pares de base na ranhura maior do DNA. As cadeias laterais dos resíduos conservados de Cys e His são descritos como bastões em complexo com o íon Zn^{2+} (roxo).

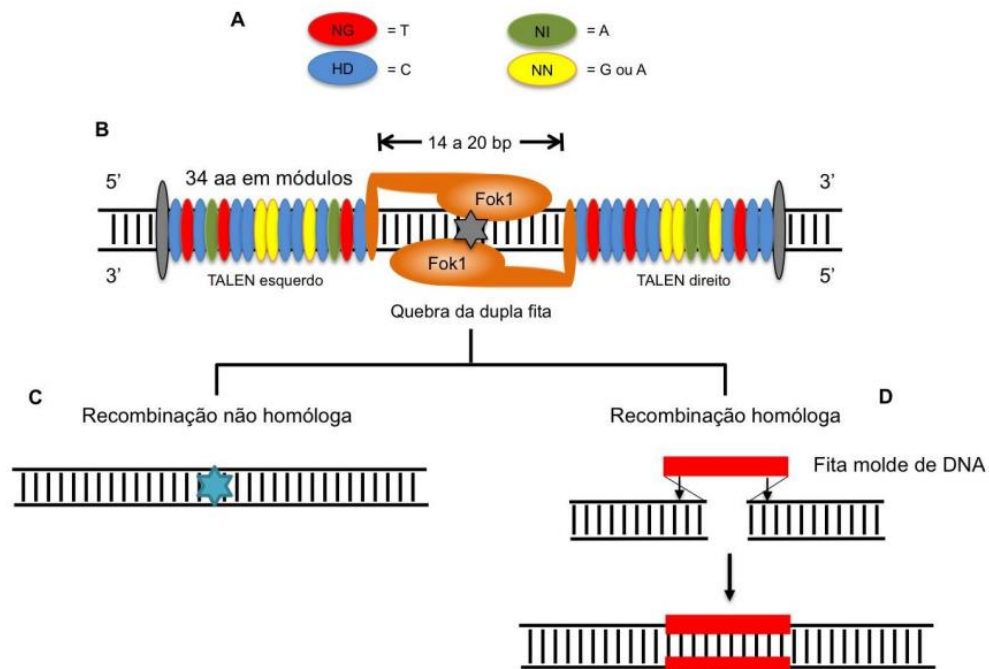
(B) Dímero de nucleases dedo de zinco (ZFN) ligadas ao DNA. O local alvo da ZFN consiste de dois dedos de zinco ligados em locais diferentes por uma sequência espaçadora de 5-7 pb reconhecidas pelo domínio de clivagem FokI. As proteínas dedo de zinco podem ser desenhadas para reconhecer unicamente os lados esquerdo e direito em cada metade do sítio.



Fonte: modificado de (GAJ; GERSBACH; BARBAS III, 2013)

Para substituir o uso do sistema ZFN, surgiu o sistema de edição de genoma TALEN – *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* ou ativador de transcrição similar a nucleases efetoras, contando com o domínio TALE que se liga ao DNA alvo. O TALE é constituído de um conjunto de repetições de 33-35 aminoácidos. Sua sequência se diferencia de outras nos aminoácidos de posição 12 e 13, que são altamente variáveis, e estes formam uma matriz de reconhecimento de nucleotídeos específicos no DNA alvo. A fabricação dessa sequência de aminoácidos é desafiadora, devido à necessidade de juntar sequências de repetição quase idênticas. Para facilitar a customização dessas sequências, foram criadas diferentes plataformas de desenho de plasmídeo que codificam matrizes de repetição do TALEN. Existem quatro cadeias de aminoácidos que se repetem, denominados RVD (*repeat variable di-residue*), que são: Asn-Asn, Asn-Ile, His-Asp, Asn-Gly, sendo suficientes para o reconhecimento específico de um dos quatro pares de base do DNA: guanina (G), adenina (A), citosina (C) e timina (T), gerando uma TALE com propriedades únicas. Além destes aminoácidos que reconhecem as diferentes bases nitrogenadas do DNA, temos o domínio de fusão das endonucleases FokI ou outro domínio funcional, capazes de realizar a mutagênese. A junção do domínio de repetições TALE com um domínio de endonucleases de FokI dá origem ao sistema TALEN (Fig. 2) (NABAIS, 2015).

Figura 2 - TALEN e os sistemas de Reparação de DNA:



Modificado de Nery, 2015

Assim como o sistema ZFN, o sistema TALEN também é um domínio de nucleases não específica fundida com um domínio FokI que se ligam ao DNA e formam DSBs num local alvo do DNA de aproximadamente 30-40 pares de base, podendo ser usada para silenciar genes ou induzir mutações (NABAIS, 2015; DING et al., 2013; VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2015). Em comparação ainda com o sistema ZFN, os TALENs são muito mais fáceis e rápidos de projetar, devido ao uso do código RVD, levando apenas dois dias para a sua construção e rendendo centenas por vez. A sua facilidade de projeto e rapidez, aliados à sua alta taxa de clivagem a tornam uma potencial abordagem terapêutica, além de serem menos tóxicas e de apresentarem maior flexibilidade devido ao seu domínio de ligação ao DNA, pois a matriz de repetições pode ser estendida para qualquer comprimento desejado. Porém, mesmo com todas essas vantagens sobre o sistema ZFN, as repetições extensas do TALEN podem ser vistas como um problema, porque elas podem acabar sendo idênticas. Outro ponto a ser discutido é quanto maior as repetições do TALEN, mais difícil se

torna encontrar vetores que o carreguem para as células, sendo necessário usar um vetor viral para a entrega eficiente e funcional deles às células. Para a utilização da técnica em células humanas são necessários vetores que façam a replicação, reparação e recombinação de forma estável, devido grande sequência dos TALENs, limitando ainda mais os vetores que podem ser usados para este fim (NABAIS, 2015).

Porém esses dois sistemas quando comparados ao CRISPR-Cas9, apresentam as seguintes desvantagens: O CRISPR-Cas9 é capaz de introduzir DSBs em vários locais simultaneamente, usando a Cas9 e vários gRNAs; ele pode ser facilmente adaptado a qualquer sequência alvo, já os sistemas ZFN e TALEN necessitam de uma proteína diferente para cada sequência alvo e quando comparados ao CRISPR apresentam uma menor eficiência formação de DSBs; além de não precisar de nucleases ligantes de DNA customizadas para cada alvo, o CRISPR-Cas9 é mais simples e adaptável, por isso se tornou rapidamente uma das mais populares abordagens para a engenharia genômica (Fig. 3). Em suma o CRISPR quando comparado aos outros sistemas de edição de genoma supracitados apresenta maior versatilidade, eficácia, especificidade e facilidade de uso (NABAIS, 2015; LOURENÇO, 2016, ADDGENE, 2017).

Figura 3 - Vantagens e desvantagens dos sistemas atuais de edição de genoma.

	TALENs	ZFNs	CRISPR-Cas
Alvo	Proteína : DNA	Proteína : DNA	gRNA-Cas9 : DNA
Domínio	Proteínas que possuam domínios de ligação de DNA reconhecem sequências específicas de DNA através dos pares de base	Os motivos de ligação de DNA <i>zinc finger</i> em determinada configuração reconhecem segmentos de três pares de bases de DNA	O crRNA de 20 nt é fundido com um tracrRNA e uma endonuclease Cas9 que reconhece sequências específicas de pares de bases
	Desvantagem		Vantagens
	Necessitam de uma proteína para cada sequência de genes		Sistema funciona apenas com um vector gRNA-Cas9
	Menor eficiência de entrega		Permite a edição de vários genes

Modificado de LOURENÇO, 2016.

4.3 História do CRISPR

Em 1987, Ishino e seus colegas sequenciaram um gene da *Escherichia coli* K12 que era responsável pela produção de uma proteína denominada iap. A frente do gene iap existia uma curiosa repetição *motif* de 29 nucleotídeos diretos repetidos e idênticos inter espaçados por um espaçador de 32 nucleotídeos variáveis, porém até então não se sabia sua função biológica (ISHINO et al., 1987). Em 1993 Groenen e seus colegas descobriram uma repetição de 36 múltiplos e diretos pares de bases inter espaçados por 35 a 41 nucleotídeos espaçadores no *Mycobacterium tuberculosis* e deram um nome a ele: Repetições diretas variáveis (Direct Variable Repeats) (GROENEN et al., 1993). Em 1995, Mojica e colaboradores estudaram esse mesmo tipo de repetição nos organismos *Haloferax volcanii* e *Haloferax mediterranei*. Elas continham uma sequência de 30 pares de bases com simetria dupla (incluindo 5 pb com repetições invertidas), estavam invertidos em tandem e inter espaçados por 33-39 nucleotídeos de sequência única, cuja sequência é altamente conservada e aparece igualmente no genoma de ambos organismos. Estas repetições foram denominadas de Repetições em Tandem (TREPs – Tandem repeats) (Mojica et al., 1995).

Em 1997, Goyal et al., estudaram a diversidade destes espaçadores através de uma técnica denominada spoligotyping, que era originada do spacer oligotyping usada pelo grupo para diferenciar cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, de modo mais rápido por não precisar de cultura das mesmas e assim determinar a origem dos surtos mais rapidamente. Também pode ser útil para o estudo da história das epidemias usando DNA antigo. Esse método foi estabelecido com sucesso e é uma técnica baseada no CRISPR (GOYAL, et al., 1997).

Logo em seguida, no ano de 2000, o grupo de Mojica continuou o estudo sobre os TREPs em bactérias e arqueas. Eles acreditavam que essas repetições constituíam uma nova família de procariotos e renomearam a sequência para SRSRs (Repetições curtas regularmente espaçadas), por serem comuns nesses seres com similaridade média de 85%. Porém a dúvida sobre a sua função biológica continuava. Em 2002 o grupo de Jansen em conjunto com o de Mojica,

introduziram um novo nome para essa repetição: CRISPRs. Jansen e seu grupo além de denominarem essas repetições como CRISPRs, também conseguiram fazer a ligação entre o gene Cas (“Associado a CRISPR”, localizado, invariavelmente, adjacente ao *loci* CRISPR) e o CRISPR. Além disso, identificaram também a existência de 4 variantes dos genes Cas entre as espécies de bactérias estudadas e que alguns organismos procariotos não o possuíam. Foi proposto, portanto, que esses genes associados ao sistema recém denominado, tinham uma relação funcional e esses genes poderiam estar envolvidos no metabolismo de DNA ou na expressão de genes nos microrganismos com o CRISPR (JANSEN et al., 2002). Pouco tempo depois, HAFT et al., encontraram 41 famílias de genes associadas ao CRISPR (Cas), aumentando a gama de Cas que se conhecia de 4 para 6 (adição das famílias de Cas 5 e 6). Além destas descobertas eles descobriram que as repetições pareciam ser transcritas e processadas em pequenos fragmentos de RNA e estas poderiam ter diversas funções, sendo resistência a fagos uma dessas funções (HAFT et al., 2005).

Mesmo com todos avanços até então não se sabia ainda qual a real função biológica do CRISPR nos microrganismos. Segundo Al-Attar et al., muitos grupos de pesquisa acreditavam em diversas funções para ele desde a regulação do desenvolvimento, repartição de replicon durante a divisão celular e até mesmo na reparação do DNA. Porém esse cenário mudou em 2005 quando 3 grupos de pesquisadores (BOLOTIN et al., 2005; MOJICA et al., 2005; POURCEL et al., 2005) descobriram que vários espaçadores do CRISPR eram homólogos a elementos móveis como fagos e plasmídeos levando-os a crer que esses espaçadores tinham origem extra cromossomal e, possivelmente, a memória de um sistema imune. O primeiro de todos a ir nessa direção foi o grupo de Pourcel, que através do estudo da bactéria *Yersinia pestis* para caracterização de suas cepas através do CRISPR descobriu que os espaçadores recém adquiridos da bactéria tinham regiões homólogas em seu genoma e que a maioria estava dentro de profagos inativos. Esta foi a primeira vez que se falou na origem desses espaçadores e que eles apresentavam um grande potencial de se tornar uma ótima ferramenta para identificação de microrganismo (POURCEL et al., 2005). Bolotin e colaboradores propuseram

que a formação das estruturas do CRISPR envolvia a fragmentação por genes da família Cas e que sua presença no DNA das bactérias se devia a sua função protetora contra DNAs estranhos (BOLOTIN et al., 2005). Já o grupo de Mojica, em 2005, mostrou que os espaçadores do CRISPR derivavam de sequências pré-existentes cromossômicas ou de elementos de transmissão genética como bacteriófagos ou plasmídeos. Eles demonstraram que esses elementos de transmissão genética não conseguiram infectar bactérias que possuíam espaçadores específicos para eles, sugerindo a relação do CRISPR e da imunidade contra DNA alvo (MOJICA et al., 2005).

No ano seguinte Makarova e seu grupo lançam a hipótese de que o sistema CRISPR era parecido com o sistema de silenciamento de genes por RNA em eucariotos, como por exemplo os RNA de interferência (siRNA). O mecanismo de silenciamento de genes por micro RNA de interferência consiste na produção destes tendo como base o RNA dupla fita de vírus e de elementos transponíveis. Estes então são processados pela nuclease Dicer, que cliva longos fragmentos de RNA dupla fita em curtos duplexos de nucleotídeos que são desenrolados pela RISCs para a produção de siRNAs maduros. É então formado um complexo entre a RISCs e o siRNA que se liga ao RNA alvo ativando a clivagem deles pela nuclease Slicer para liberar o RISCs-siRNA que age como catalisador de reciclagem.

Apesar de todas as hipóteses acerca do CRISPR atuar junto das Cas para conferir imunidade para as bactérias, até então nenhum experimento comprovando-as havia sido realizado. Em 2007, o grupo de Barrangou analisou a bactéria *S. thermophilus* e as infectou com dois tipos de fagos bastante comuns na indústria de laticínios. Logo eles notaram que foram inseridas novas sequências aos espaçadores no gene do CRISPR que conferiu às bactérias resistência aos bacteriófagos. Seus resultados em conjunto com os de Makarova impulsionaram outros pesquisadores a explorarem essas hipóteses e determinar, de fato, qual o papel biológico do sistema CRISPR-Cas. Nos anos seguintes, diversas descobertas acerca do assunto contribuíram para comprovar que se trata de um sistema imune ativo de procariotos contra a propagação de vírus e elementos conjugativos (HE; DEEM, 2010 apud AL-ATTAR, 2011, p. 278).

Em 2011, o grupo de Emmanuelle Charpentier caracterizou os mecanismos do amadurecimento da molécula crRNA (DELTCHEVA et al., 2011). Em 2012, o grupo de Jennifer A. Doudna e Emmanuelle Charpentier deram continuidade à busca de como funcionava o mecanismo do CRISPR-Cas9, demonstrando que o ativador tracrRNA e o localizador crRNA podem ser unidos formando apenas uma única fita de RNA que guia e ativa a Cas9 a realizar as quebras nas duplas fitas de DNA. Uma das quebras é feita pelo domínio HNH e a outra pelo domínio RuvC da Cas9, estabelecendo pela primeira vez o que se conhece hoje como single guided RNA (sgRNA) (JINEK, M. et al., 2012).

Em 2013, o grupo de Jennifer A. Doudna estabeleceu o CRISPR-Cas9 como um sistema que pode ser usado como ativador ou silenciador de genes, através da versatilidade da Cas modificada (dCas9) que pode recrutar proteínas afim de aumentar a expressão de um determinado gene ou ser acoplado a ela um domínio repressor e impedir a transcrição de um determinado gene de forma específica e flexível em células eucariotas (GILBERT et al., 2013).

Em 2014, o grupo de Jennifer A. Doudna desvendou o mecanismo por trás do reconhecimento da Cas9 e RNA guia com o DNA para identificar as sequências alvos. Concluíram que o complexo gRNA-Cas9 somente se liga ao DNA caso ele tenha uma sequência PAM adjacente e somente há a clivagem na dupla fita caso este seja localizado. Portanto, a Cas9 usa o reconhecimento da sequência PAM para escanear rapidamente a sequência alvo em meio a grandes moléculas de DNA (STERNBERG, et al., 2014).

4.4 O CRISPR e o seu funcionamento

O CRISPR é um sistema de defesa de bactérias (eubactérias e arqueobactérias), cujo principal papel é bloquear fases de vida de um fago que tenta invadir a célula bacteriana, impedindo a adsorção e prevenindo a injeção do DNA viral, garantindo à bactéria proteção contra elementos genéticos móveis (EMG), tais como plasmídeos e fagos, que tentam incorporar seu DNA ao da célula hospedeira no *locus* do CRISPR. O *locus* do CRISPR é uma sequência de repetições idênticas no DNA bacteriano inter espaçadas por uma sequência altamente variável chamada de espaçadores. O gene CRISPR juntamente com o gene das enzimas Cas codificam proteínas conservadas e RNAs que são responsáveis pela defesa de células procariotas contra invasores (AL-ATTAR, 2011). O CRISPR é formado então pela aquisição de DNA exógeno, que será inserido nos espaçadores entre as repetições e a imunidade conferida pelo CRISPR pode ser passada de geração em geração pelas bactérias.

Para que esse sistema possa agir no DNA exógeno, é necessário que os genes Cas associados ao CRISPR estejam presentes. Os genes Cas ficam adjacentes ao CRISPR e codificam proteínas, cuja função é identificar os genes invasores e incorporá-lo no gene do CRISPR. Quando o gene invasor é incorporado nos espaçadores do CRISPR, uma nova infecção pelo mesmo não é mais possível. Novos espaçadores podem ser incluídos na extremidade do CRISPR, fazendo com seja possível rastrear cronologicamente as infecções sofridas por determinado organismo. Após a transcrição do gene do CRISPR, são formados pequenos fragmentos de RNA (sRNA) que em conjunto com as enzimas Cas, expressas do gene Cas adjacente ao CRISPR, formarão um complexo ativo que se ligará ao DNA alvo exógeno por complementaridade de bases e este complexo clivará a região alvo do DNA exógeno, inativando qualquer tipo de EMG (LOURENÇO, 2016).

O *locus* do CRISPR será transcrito numa cadeia percussora de RNA não codificante (pre-crRNA), estas hibridizam com um segundo RNA não codificante, o trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA), formando uma dupla cadeia de RNA que é quebrada e processada pela host fator ribonuclease III (RNase). Essa dupla cadeia então se associa com a nucleasse Cas9, formando um complexo

que reconhecerá e destruirá DNAs invasores. Esta estrutura formada, que tem o crRNA com o espaçador, tem afinidade pela sequência alvo ligando-se a ela por complementaridade, levando junto a Cas9. O domínio HNH da Cas9 cliva a cadeia complementar e o domínio RuvC cliva a cadeia não complementar, gerando um duplo corte na dupla cadeia de DNA. Esse corte só ocorrerá se estiver presente uma pequena sequência alvo denominada PAM adjacente à sequência alvo (RAMOS, 2016).

A edição de genoma é uma possibilidade recente e que pode ser feita atualmente graças a ferramentas novas que nos permitem fazer modificações no DNA. As ferramentas mais utilizadas atualmente são: Zinc Finger Nucleases (ZFNs), Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs) e o Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) tipo II. A mais recente, promissora e de maior destaque dentre as anteriores é a CRISPR Cas9 tipo II (LOURENÇO, 2016).

4.5 Componentes do CRISPR

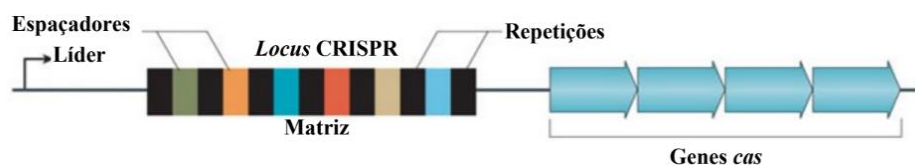
4.5.1 Matriz

O sistema do CRISPR em bactérias é composto por uma **matriz**, que se alterna entre os espaçadores. Cada matriz é composta por cerca de duas a cem repetições, podendo existir matrizes mais longas como na bactéria *Haliangium ochraceum*, cuja matriz possui 588 repetições. Essas repetições em sua grande maioria se encontram no DNA bacteriano podendo ser encontradas também em plasmídeos (LOURENÇO, 2016).

4.5.2 Sequência líder

Além da matriz, é necessária uma **sequência líder**, que são sequências que se encontram inseridas na matriz e se orientam para a sequência de repetição adjacente ao CRISPR. Não codificam proteínas e tem baixa complexidade. Sua função é conter o principal promotor para a transcrição do *locus* anexo ao CRISPR. Caso a sequência líder não esteja presente é observado baixos níveis de transcrição, usando como promotor regiões aleatórias dos espaçadores ou do interior de uma repetição. Uma outra função da sequência líder é ser o local de aquisição onde os novos espaçadores são incorporados, perto da primeira repetição (LOURENÇO, 2016).

Figura 4 - Matriz e sequência líder:



Modificada de (LOURENÇO, 2016)

4.5.3 Cas9

É uma endonuclease não específica associada ao CRISPR. Estruturalmente ela contém dois domínios enzimáticos independentes: o domínio HNH e o domínio RuvC. Cada domínio é responsável pela quebra de uma das cadeias de DNA. O domínio HNH, é estruturalmente simples e cliva a cadeia complementar do DNA. Já o domínio RuvC tem estrutura mais complexa e cliva a cadeia não complementar do DNA dupla fita (Fig. 5). A Cas9 também possui dois lóbulos com funções diferentes: o lóbulo REC de reconhecimento e o lóbulo NUC, de nuclease. No domínio REC a Cas9 interage com o RNA/DNA de várias variadas, dependendo da conformação adquirida e logo não possui direcionamento sem o crRNA-tracrRNA para poder exercer sua atividade. Porém, mesmo possuindo o crRNA-tracrRNA o seu processo de clivagem não é totalmente específico, podendo ocorrer clivagens off-target (fora da sequência alvo) (RAMOS, 2016).

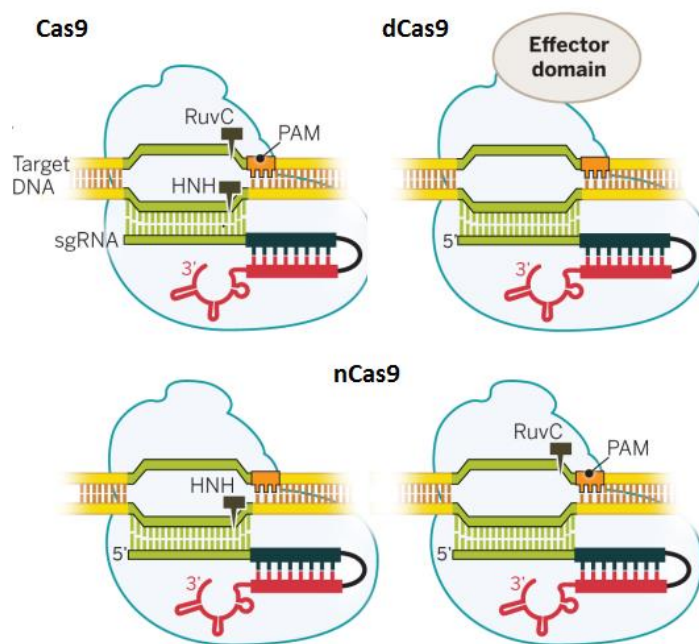
4.5.4 Nickases Cas9/ variantes da Cas9

Pode-se produzir diversas variações da Cas9 inativando um dos seus domínios (HNH ou RuvC). Por meio de pequenas mutações pontuais gera-se as nickases, que são Cas9 com apenas um domínio catalítico. As nickases são muito úteis na engenharia genética, por clivarem apenas uma das fitas do DNA alvo (RAMOS, 2016).

Para aumentar a especificidade da Cas9 e diminuir regiões off-target foi produzido um complexo com duas nickases, conhecida como nCas9, seguindo a analogia dos dímeros do sistema ZFN e TALEN, aumentando o número de bases reconhecidas e criando um corte não reto. O complexo cliva o DNA em duas regiões, assim como a Cas9 sem alteração, porém o seu uso aumenta a eficiência e a correção na reparação e qualquer clivagem off-target é reparada de forma mais precisa, além de tornar possível a inserção de fragmentos de interesse, uma vez que este tipo de quebra deixa livre algumas bases que se ligarão mais facilmente ao fragmento inserido (RAMOS, 2016; BIOTEC, 2017). Abaixo podemos ver os diferentes tipos de Cas9. Caso os dois domínios sejam

inativados, ela perde a sua função catalítica, sendo chamada de dead Cas9 ou dCas9 podendo ser usada para ensaios que não necessitem clivagem pela Cas9, como por exemplo, localização in situ, ativação ou supressão de um gene, entre outros (RAMOS, 2016; BIOTEC, 2017).

Figura 5 – Variantes do Cas9



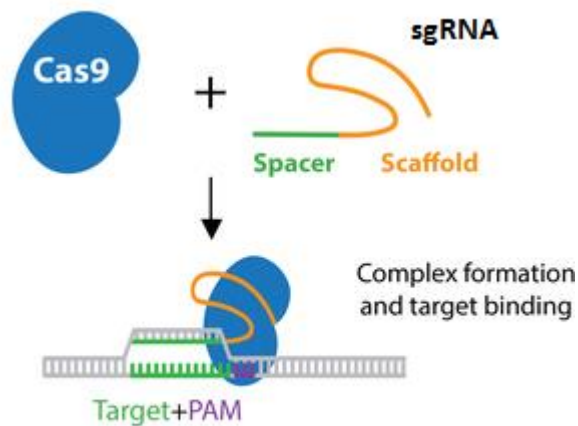
Modificado de (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014)

4.5.5 sgRNA

sgRNA é uma sequência sintética curta de RNA composto por uma sequência molde necessária para a Cas9 se ligar e uma sequência de 20 nucleotídeos chamada espaçador ou alvo definida pelo usuário que define o alvo a ser modificado. Para modificar o alvo da Cas9, basta alterar a sequência do sgRNA (ADGENE, 2017).

Para que o sgRNA se ligue à sequência alvo é necessário que adjacente a ele exista uma sequência de 20 nucleotídeos chamada PAM, que é essencial para o desenrolamento da Cas9 até o alvo (Fig. 6). Na ausência do PAM, a Cas9 não reconhece o sítio alvo mesmo que a sequência de sgRNA seja complementar a ela, pois é por meio da interação entre um sítio da Cas9 e o PAM que ocorre a separação da dupla fita de DNA, permitindo a clivagem em seguida. Diferentes sistemas CRISPR requerem diferentes PAMs bem como diferentes Cas9 necessitam de PAMs específicos. A Cas9 tem a capacidade de reconhecer vários PAMs, porém com eficiência diferente podendo gerar regiões off-target, devido a essa alta versatilidade (RAMOS, 2016).

Figura 6 – Single guide RNA e PAM



Modificado de (ADDGENE, 2017)

4.6 Funcionamento do CRISPR-Cas9

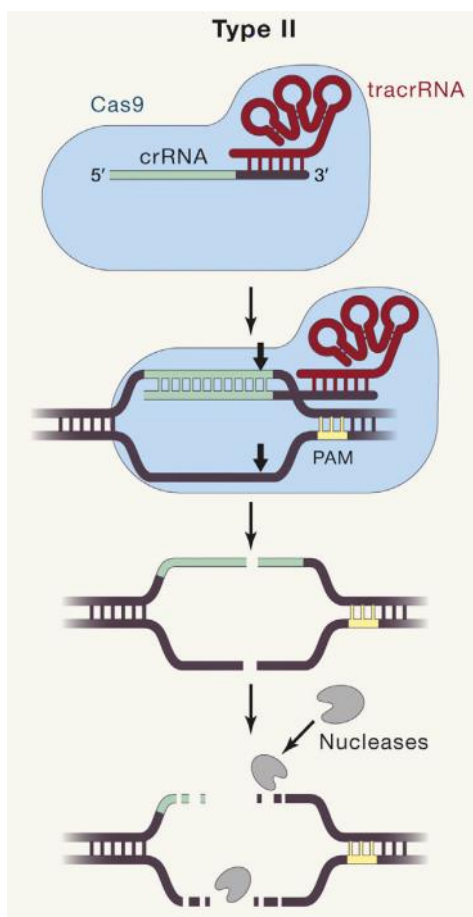
O CRISPR era usado originalmente para desligar genes alvos em vários tipos celulares e organismos, mas modificações feitas a Cas9 possibilitaram estender a sua aplicação para reprimir genes seletivamente, purificar certas regiões do DNA em células vivas e até mesmo visualizar o DNA em células vivas usando microscópio de fluorescência. A facilidade de gerar diferentes sgRNA torna o CRISPR uma das tecnologias de edição de genoma mais escalável e, mais recentemente, tem sido usada para genomas mais amplos (ADDGENE, 2017).

O uso do CRISPR pode gerar células ou animais com genes deletados, por meio da co-expressão de um sgRNA específico ao gene alvo do CRISPR-Cas9 que localiza uma sequência única em todo o genoma (sequência acima de um PAM específico para este tipo de CRISPR). A espécie de CRISPR Cas9 mais usada na engenharia genética é a advinda da bactéria *Streptococcus pyogenes*.

O sgRNA e a proteína Cas9 expressos formam um complexo ribonuproteico. O domínio molde do sgRNA e a superfície exposta carregada positivamente deslizam pela Cas9. A interação entre as duas, torna o complexo ativo e a região que se ligará ao DNA alvo fica livre para identificar o DNA a ser

cortado. Ao se ligar, a região 3' da sequência alvo no sgRNA começa a anelar ao DNA do gene alvo. Se a sequência alvo for compatível, a sequência do sgRNA continuará a se ligar ao DNA alvo, na direção 3' para 5'. A Cas9 somente irá clivar se houver compatibilidade mínima. Caso o anelamento tipo zíper na região 3' da sequência do sgRNA não seja compatível com a do DNA alvo no gene a clivagem não é feita, porém caso haja erros na região 5' o mesmo não ocorre. Ao se ligar, a Cas9 passa por uma segunda mudança conformacional que permite que ela clive a fita oposta ao alvo, fazendo uma clivagem de fita dupla, conforme podemos ver na imagem abaixo (fig. 7):

Figura 7 – Funcionamento do CRISPR-Cas e a formação da quebra na dupla fita do DNA



Modificada de (HILLE, 2018)

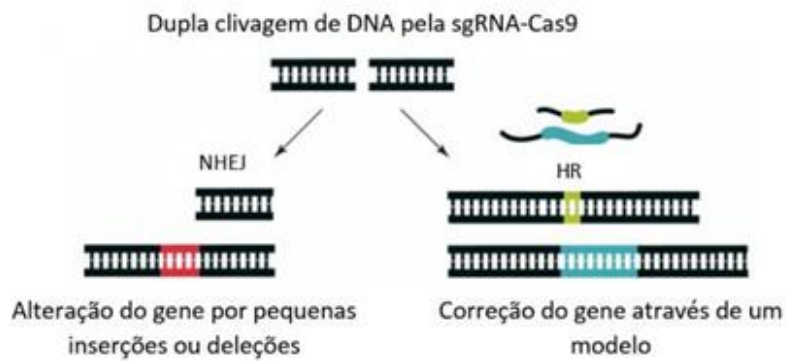
4.6.1 Mecanismos de reparo na clivagem pelo CRISPR-Cas9

A recombinação homóloga direta (HDR) e a junção de extremidades não-homólogas (NHEJ) são as duas principais vias de reparo do DSB (região clivada) que operam em eucariotas. A HDR é funcional apenas durante a fase de replicação do DNA no ciclo celular, fazendo uso de um modelo homólogo das cromátides irmãs para restaurar a informação genética perdida. NHEJ, por sua vez, ocorre durante todo o ciclo das células, e pode ocorrer pela união de uma ponta a outra do DNA rompido independente do DNA molde. Como a HDR faz uso de informações de um molde para reparar o DSBs, a união é precisa, em oposição a NHEJ, que envolve principalmente a adição ou supressão de poucas bases resultando em erros. Apesar da junção imprecisa, NHEJ é de primordial importância para preservar a integridade genômica em células de mamíferos, pois é um processo rápido e está ativo durante todo o ciclo celular (Vartak e Raghavan, 2015). A reparação via HDR (Homology directed repair - HDR) não é tão eficiente quanto à NHEJ, mas é fiel a homologia da fita: porque necessita de uma sequência molde sintética corretiva para fazer o reparo, diminuindo o erro (ADDGENE, 2017; RAMOS, 2016).

NHEJ é muitas vezes referida como o "Quick-Fix" ou conserto rápido e envolve várias peças-chave, agindo de forma coordenada. Após a indução de um DSB, o complexo de proteínas ku (KU70/KU80), que está abundantemente presente no núcleo, se liga rapidamente às extremidades do DNA rompido, protegendo assim as extremidades do DNA da degradação aleatória. O complexo do Ku-DNA recruta as proteínas a frente ao local do reparo. Estudos sugerem que a proteína PAXX liga a Ku e estabiliza a maquinaria NHEJ na cromatina danificada. Já o complexo Artemis DNA PKcs serve como uma nuclease, que contempla diferentes atividades endonucleolíticas e, por fim, as polimerases da família do pol X, isto é, pol I e pol k, realizam a polimerização durante a NHEJ. A vedação final da ruptura de DNA então é catalisada pelo complexo DNA ligase IV – XRCC4 – XLF conforme podemos ver na imagem abaixo.

Figura 8 - Mecanismos de reparo do DNA por NHEJ e HDR:

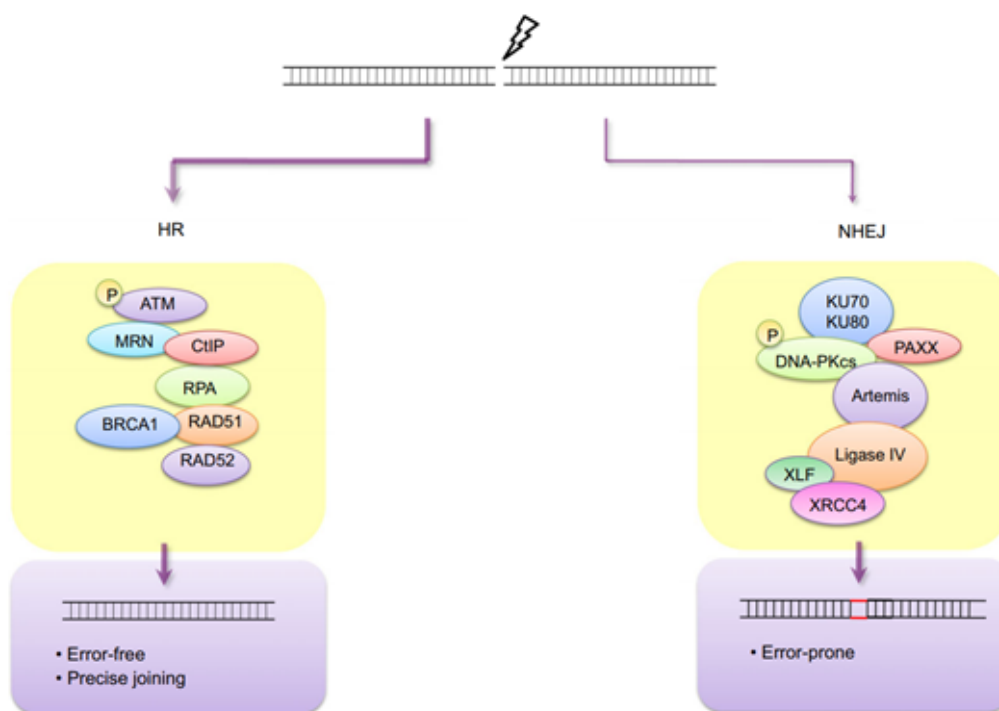
Mecanismos de reparação homóloga e não homóloga após a clivagem pelo complexo sgRNA-Cas9;



Modificado de (Ramos, 2016).

Figura 9 - Mecanismos de reparação do DNA NHEJ e HDR (com vias):

Principais vias de reparo do DNA: HDR e NHEJ. Cada caminho tem seu próprio repertório de proteínas, como mostrado acima. A espessura da seta retrata a frequência com que o caminho específico ocorre dentro das células. As proteínas associadas a cada via também são indicadas.



Modificado de (Vartak e Raghavan, 2015).

4.6.2 Efeito off-target

O efeito off-target é observado quando há cortes em sequências que não são a sequência de interesse. Esse fenômeno pode ocorrer, porque em teoria uma única sequência nucleotídica deveria corresponder a uma única sequência alvo, com uma região PAM característica. Entretanto, verificou-se que existe mais do que uma única sequência PAM que pode ativar a mesma endonuclease, porém com afinidade diferentes. No caso da Cas9, oriunda de *S. pyogenes*, a sequência “NGG” é reconhecida como sequência ótima, porém a Cas9 também pode reconhecer a sequência “NAG”, com menor frequência. Às vezes evidenciamos regiões off-target quando apenas o PAM é reconhecido, porém a sequência alvo não é e ainda assim a Cas9 efetua o corte ou quando temos regiões beirando um PAM e a sequência alvo é parcialmente complementar

também levando a quebra pela Cas9. Apesar destes problemas, existem bibliotecas com sgRNAs para desenvolver a melhor sequência para o DNA alvo. A criação destes sgRNAs seguem as seguintes regras: a existência de uma guanina próxima do PAM torna mais fácil da Cas9 reconhecê-la; nucleotídeos de timina próximo do PAM não são favoráveis, pois a RNA polimerase III reconhece a uracila do sgRNA como um sinal de término, levando a uma expressão menor de sgRNA; já os nucleotídeos de citosina são preferidos no local de clivagem de DNA, enquanto que o sgRNAs ricos em guanina são mais estáveis quando comparado aos ricos em adenina. Todo o desenho desses sgRNAs é feito por softwares de bioinformática (RAMOS, 2016; DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

4.6.3 Entrega do CRISPR-Cas9 às células

Um grande desafio é a entrega da maquinaria do CRISPR às células. Somente o sgRNA tem cerca de 100 pb e normalmente o promotor tem cerca de 500 pb. O gene spCas9 tem uma carga de 4,2 kb, enquanto que os vetores mais usados para terapia gênica com outros métodos, como vetor viral AAV (Adeno-associated vírus), tem o tamanho de 4,5 kb, limitando a entrega do mesmo às células. Para superar essas limitações foram construídos vetores com o citomegalovírus que incorporou eficazmente toda a maquinaria do CRISPR-Cas9. Além desta solução foram desenvolvidos vetores AAV que entregam, separadamente, o gene que codifica a Cas9 e o sgRNA com promotores específicos (NABAIS, 2015).

Os métodos mais usados e mais eficientes no transporte do CRISPR-Cas9 até as células são: por meio de plasmídeos, vetores virais, ribonucleoproteínas, peptídeos de penetração celular, nano partículas com base de lipídios, DNA nanoclews e nano partículas de ouro ou injetado diretamente (KIM ET AL., 2014; RAMOS, 2016, WANG ET AL., 2017).

4.6.4 Plasmídeos

É um dos mais populares em comparação aos demais principalmente pela facilidade na sua fabricação *in vitro*. As células são transfectadas ao mesmo tempo com plasmídeos que codificam tanto a Cas9, crRNA e tracrRNA através de eletroporação ou lipofecção (RAMOS, 2016; KIM, 2014).

O método foi simplificado, e hoje é possível usar um plasmídeo que codifica o sgRNA e um outro plasmídeo que tem o gene tanto para o sgRNA quanto para a Cas9, reduzindo de três para um plasmídeo, permitindo então rearranjo dos plasmídeos e codificação de vários sgRNAs para múltiplos alvos (RAMOS, 2016).

Em seres humanos somente é possível o uso deste método *in vitro*, onde a modificação genética ocorre em cultura de células e depois as mesmas serão transplantadas para o ser humano, pois *in vivo* mostrou baixa entrega do material genético, bem como silenciamento epigenético, além de integrar aleatoriamente o maquinário do CRISPR-Cas9, aumentando as chances de efeitos off-target e mutações por inserção (RAMOS, 2016). Além destas dificuldades, segundo Kim et al. (2014) inserções não desejadas do plasmídeo em regiões fora do alvo são mais difíceis de descobrir do que aquelas em regiões dentro do alvo e podem causar respostas imunes no hospedeiro prejudicando o uso da edição de genes em células primárias ou em células tronco em terapia celular, além da transfecção geralmente ser estressante para as células. As nucleases projetadas pelo RNA podem permanecer ativas por longos períodos após a transfecção fazendo com que ele se expresse por mais tempo nas células aumentando as chances de edições fora do alvo. Tendo em vista essas complicações, todas as células transfeccionadas com plasmídeos são consideradas células geneticamente modificadas e precisam que este procedimento seja aprovado por autoridades reguladoras de cada país, um processo longo e burocrático (KIM ET AL., 2014).

4.6.5 Vetores virais

Os vetores virais são bastante utilizados quando se deseja inserir um material genético exógeno numa célula primária ou quando não houve efetividade no uso de plasmídeos (RAMOS, 2016).

Vetores como o Lentivírus conseguem cumprir sua função de carregar o material genético exógeno até a célula, porém ele o integra de forma aleatória, podendo gerar inserções fora do alvo. Para corrigir o problema, são usados vetores virais não integrativos, como os adenovírus e os vírus adeno-associados (AAVs), no qual seu DNA viral é eliminado após alguns ciclos de mitose. Sua grande utilização se deve a sua natureza episomal, que dá a ele grande capacidade de ser clonado e transduzido em muitas linhagens de células, além da facilidade de sua produção (RAMOS, 2016).

In vitro, os adenovírus mostraram boas taxas na relação da eficiência empacotamento e tamanho dos vírus, enquanto que *in vivo* eles induzem uma resposta imune rápida no hospedeiro, com aumento de citocinas, podendo levar a destruição das células. Já os AAVs induzem uma rápida resposta imune, que pode levar a uma expressão duradoura em células que não estejam se dividindo. Os AAVs são pequenos levando a preocupações em torno do seu processo de empacotamento, porém este problema pode ser resolvido usando-se a Cas9 da bactéria *Staphylococcus aureus* que é menor e possui a mesma eficiência da Cas9 do *S. pyogenes* (RAMOS, 2016).

4.6.6 Lipofecção

É um dos mais comuns métodos de entrega de ácidos nucleicos. A lipofecção é um método de transfecção onde associam-se ácidos nucleicos com nano partículas lipídicas de formulação catiônica, resultando em complexos moleculares chamados de lipoplexos que são tomados pelas células via endocitose e macropinocitose (Gori et al., 2015). As principais vantagens do uso de lipofecção são: sua alta eficiência, habilidade de transfectar todos tipos de ácidos nucleicos em vários tipos celulares, facilidade no uso, reprodutibilidade, baixa toxicidade e boa eficiência em alguns modelos *in vivo*. O reagente com base de lipídio normalmente é composto de lipídios catiônicos sintéticos que às

vezes são misturados com lipídios ajudantes como o DOPE (1,2-dioleoil-fosfatidil-etanolamina) ou colesterol. Então esses lipídios se misturam em lipossomos ou micelas com carga positiva no pH fisiológico e formam complexos (lipoplexos) com ácidos nucleicos carregados negativamente através de interações eletroestáticas. A interação entre os ácidos nucleicos com os complexos resulta em uma compactação firme e proteção dos ácidos nucleicos. Esses complexos são internalizados pelas células na maior parte das vezes por endocitose (OZBIOSCIENCES, 2018).

4.6.7 Ribonucleoproteínas (RNPs)

É um método alternativo ao uso de plasmídeos ou vetores virais e tem potencial de produzir menos efeito off-target por não ter uma expressão prolongada da Cas9 e do sgRNA, além de evitar integrações de DNA indesejados. Este método leva até a célula a Cas9 conjugada com o sgRNA e imediatamente após serem injetadas, elas induzem a alteração no gene alvo com uma porcentagem de efetividade mais alta do que os métodos anteriores, degradando-se em seguida (RAMOS, 2016).

O complexo entre sgRNA e a Cas9 é produzido rapidamente *in vitro*, podendo ser usado em várias linhagens celulares humanas. Elas são introduzidas nas células por microinjeção direta com agulha de gelo, por eletroporação ou por lipossomas catiônicos (lipofecção). A entrega dos RNPs às células é mais efetiva quando as células em cultura estão na mesma fase da divisão celular. Além dos meios citados, é possível também introduzir os RNPs conjugando a Cas9 + sgRNA + proteínas de penetração celular que sejam capazes de leva-las até o núcleo das células sem matá-la (RAMOS, 2016).

4.6.8 Peptídeo de penetração celular (CPP)

Este método já vem sendo usado para entregar as nucleases efetoras semelhantes a ativador de transcrição (TALENs) e as nucleases dedo de zinco (ZFN). Segundo Ramakrishna e seu grupo a Cas9 e o sgRNA foram modificados conjugando e complexando geneticamente a eles peptídeos de penetração celular (CPP). Ao adicionarem esses peptídeos conjugados ao CRISPR eles obtiveram a clivagem nos genes de células humanas com o mínimo de mutações off-target quando comparadas com a transfecção por plasmídeos.

As vantagens observadas com esse método são: diminuição de potenciais problemas vistos com o uso de plasmídeos como a integração incontrollada do DNA do plasmídeo no genoma hospedeiro e respostas imunes não desejadas causadas por plasmídeos bacterianos, além de não conter genes de resistências à antibióticos que podem ser passados para bactérias patogênicas. A sua baixa taxa de regiões off-target se deve ao fato das moléculas modificadas do CRISPR ficarem pouco tempo disponíveis dentro da célula, pois são rapidamente degradadas (Ramakrishna et al., 2014).

Este método pode ser amplamente manufaturado devido à sua facilidade em customizar os peptídeos.

4.7 Terapia Gênica

Terapia gênica consiste em inserir, em um ser vivo, DNA sadio, buscando que este substitua, manipule ou suplemente genes inativos ou disfuncionais (LINDEN, 2010). De acordo com Artioli et al. (2007), terapia gênica é um conjunto de técnicas que permitem a inserção de um gene sadio em células alvo que apresentam algum tipo de desordem genética hereditária ou não, gerando a correção dos produtos gênicos inadequados. O material sadio inserido tem por objetivo gerar proteínas funcionais (ou aumentar a sua produção), regular a expressão de outros genes, ativá-los ou inativá-los. Segundo o DeCs (Descritores em Ciências da Saúde), a definição exata de terapia gênica é: “são técnicas e estratégias que incluem o uso de sequências gênicas codificadoras e outros meios convencionais e radicais para transformar ou modificar as células com o propósito de tratar ou reverter situações de doença”.

O conceito de terapia gênica existe mesmo antes de conhecermos as ferramentas de DNA recombinante. Nos anos 60 aconteceu a primeira tentativa de terapia gênica, usando DNA para tratar hiperargininemia com a aplicação do vírus papiloma de Shope, conhecido por expressar arginase, porém não houve melhora clínica. Na década de 70, foram feitos os primeiros vetores e logo tinham-se as ferramentas necessárias para a terapia gênica. Em 80, a tecnologia do DNA recombinante conquistou a comunidade científica e pela primeira vez um vetor recombinante foi testado em humanos como veículo de modificação do genoma. Este primeiro passo tinha por objetivo tratar a β -talassemia transferindo o gene da β -globina para as células do paciente.

Este experimento não resultou em melhora clínica do paciente e o pesquisador responsável sofreu censura por executar o protocolo clínico sem prévia autorização dos órgãos na época. Estes exemplos levaram os pesquisadores a serem mais cautelosos e a investigarem melhor o protocolo antes de ir para a fase clínica. Em meados de 90, foi realizado o primeiro protocolo clínico com autorização do FDA (Food and Drug Administration), com o objetivo de tratar 2 pacientes com imunodeficiência primária, sendo que um dos pacientes obteve melhora, sendo praticamente curado e com poucos efeitos colaterais. Estes avanços na terapia gênica impulsionaram o seu crescimento e

disseminação, e até a data de 2015 foram executados cerca de 2140 protocolos clínicos com terapia gênica ao redor do mundo (COSTANZI-STRAUSS; STRAUSS, 2015).

Ainda de acordo com COSTANZI-STRAUSS e STRAUSS (2015) podemos elencar diversos estudos que obtiveram sucesso na técnica como terapias para Imunodeficiência severa combinada-deficiência de adenosine deaminase (ADA-SCID), Imunodeficiência severa combinada-deficiência de IL2RG (X-SCID), Doença granulomatosa crônica ligada ao X (X-CGD), Síndrome Wiscott-Aldrich (WAS), entre outras. A maioria dos exemplos são de doenças monogênicas, especialmente às que podemos tratar as células tronco hematopoiéticas. Além disso diversos vetores já foram aprovados e estão sendo comercializados. Os estudos com um número maior de pacientes são os direcionados para o tratamento de câncer e até 2015 cerca de 67% dos estudos em fase clínica III e 100% dos estudos em fase IV tinham como alvo o tratamento do câncer.

4.8 Aplicações do CRISPR-Cas9 na terapia gênica

Um dos primeiros casos de edição de genoma *in vivo* bem-sucedido foi obtido pelo grupo de Yin em 2014. Yin et al (2014) propuseram a correção da tirosinemia hereditária do tipo I num modelo de rato para a doença. A doença é causada pela mutação na enzima fumarilacetato hidrolase (FAH), responsável pela última etapa da catabolização da tirosina. O modelo animal possui mutação pontual G→A no último nucleotídeo do éxon 8, semelhante a do ser humano. Esta mutação faz com que no splicing e formação da proteína esse éxon seja excluído, gerando a proteína instável FAH. A deficiência desta proteína gera acúmulo de metabólitos tóxicos como o fumarilacetato nos hepatócitos levando a danos severos ao fígado. Para esse estudo foi usado um sgRNA e a Cas9 além de um DNA dupla fita doador com a sequência sem a mutação. A maquinaria do CRISPR foi entregue através de um vetor (pX330) enquanto que o dsDNA foi através de oligo. Após três meses do estudo foi observado grande melhora no quadro de sintomas correlacionados à doença nos animais, desde a diminuição da perda de peso ao aumento de hepatócitos que produziam a enzima FAH normal.

Em 2014 Ding e seu grupo propuseram a edição no genoma de ratos no gene PCSK9, responsável pela produção da proteína PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9), cuja deficiência está correlacionada com a redução dos níveis de LDL (proteína carregadora de lipídios de baixa densidade) e proteção contra doenças cardiovasculares. Portanto, o objetivo do estudo foi inserir mutações no gene associado a esta proteína de modo a fazê-la perder a sua função, tornando os ratos deficientes para esta proteína. Foi usado adenovírus para a entrega da maquinaria do CRISPR-Cas9. Como resultado, após pelo menos 4 dias da administração do material genético houve uma taxa de mutação no gene alvo superior a 50%, levando a diminuição dos níveis de LDL no plasma. Não houve mutação off-target, mostrando que a edição do gene alvo foi eficiente e fazendo desta abordagem um potencial candidato para edição de genoma em humanos.

Para demonstrar o potencial da técnica de forma mais complexa, foram feitos diversos experimentos com embriões, cuja aparelhagem do CRISPR-Cas9 introduzida num zigoto ou numa fase embrionária precoce proporcionando

modificações no genoma de todas as células do organismo, bem como as células de linhagem germinativa, podendo essas alterações permanentes serem transmitidas para os descendentes, possibilitando a eliminação de doenças hereditárias (RAMOS, 2016).

Em 2013, Wu e seu grupo corrigiram com o CRISPR-Cas9 uma doença genética, um tipo de catarata cuja causa está na mutação dominante no gene *Crygc*. No seu estudo, o CRISPR-Cas9 (sgRNA e mRNA da Cas9) foram injetados em zigotos e o sgRNA teve como alvo o alelo mutado do gene *Crygc*. A mutação gera a deleção de um par de bases no éxon 3 do gene *Crygc*. O experimento teve uma alta taxa de correção da mutação, sendo que dos 22 filhotes nascidos, 10 apresentaram alterações no seu DNA, conferindo a 6 deles o fenótipo sem a doença.

Para a edição de genomas células somáticas *ex vivo* são necessários protocolos rígidos para que depois da correção do gene as células possam ser replantadas no indivíduo (RAMOS, 2016).

Desde 2007 é possível desenvolver células estaminais induzidas a partir de fibroblastos humanos (iPSCs). As iPSCs se propagam infinitamente e podem se diferenciar em qualquer célula do organismo. Além deste tipo de reprogramação celular, há também a reprogramação direta de células somáticas, que tem menores passos de reprogramação celular, diminuindo as mutações não desejadas.

Em 2014, o grupo de Xie usou o CRISPR-Cas9 para reprogramar iPSCs para o tratamento da β -talassemia em células de paciente duplamente heterozigoto para as mutações (mutações no promotor na região -28 A/G e deleção de 4pb (TCTT) do códon 41 e 42 do éxon 2 no gene *HBB*) que geram a doença. Antes de injetar o sgRNA nas iPSCs, foi feito um teste para avaliar a eficiência da transfecção e nele foram transfectados o sgRNA em linfócitos T, rendendo uma taxa de eficiência de transfecção superior a 60%. Foi também avaliado a taxa de DSB de cada sgRNA e a mais eficiente foi utilizada. O método usado para entrega do CRISPR-Cas9 foi um plasmídeo. Como conclusão, a correção foi efetiva e não foram observados efeitos off-target nas iPSCs corrigidas. As células mantiveram sua capacidade pluripotente e apresentaram cariótipos normais. Para avaliar a efetividade da recombinação homóloga em protocolos *ex vivo*, é feito um processo de seleção das células, por meio da

adição de um gene de resistência a um antibiótico. Apenas as células que tiverem o gene de resistência, as mesmas que sofreram recombinação homóloga, serão selecionadas. Após a seleção das células que sofreram recombinação homóloga, as mesmas são separadas para sofrerem a diferenciação celular em precursores funcionais de células sanguíneas que podem ser usadas para transplantação (RAMOS, 2016). Ainda de acordo com Ramos (2016), a vantagem da terapia gênica *ex vivo* é poder selecionar e analisar as células antes de transplantá-las. Apenas as células que tiverem o gene corrigido e não apresentarem mutações off-target serão transplantadas de volta no paciente, aumentando a eficiência e precisão do tratamento.

Outra aplicação de terapia gênica com a ferramenta CRISPR-Cas9 *ex vivo* é na tentativa de combater o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Existem diversos estudos que buscam combater a infecção pelo vírus, uma vez que ele se integra no genoma do hospedeiro por toda a sua vida. O vírus se esconde nos linfócitos T de memória no período de latência, mesmo na presença de fármacos antivirais. Uma forma de combater a infecção é direcionando a Cas9 para a porção do DNA que está com o DNA viral integrado dos linfócitos T infectados (RAMOS, 2016).

Num desses estudos, em 2015, o grupo de Liao usou CRISPR-Cas9 para interromper o genoma viral integrado na fase de latência, para assim fornecer a defesa adaptativa a longo prazo para novas infecções virais, expressão e replicação do HIV em células humanas. Para isso eles usaram sgRNAs tendo como alvo genes responsáveis pela integração do DNA viral nas células humanas. Foram usadas as células HEK 293A e os genes específicos para alvo foram os genes: gag e env (estruturais), pol (enzimático) e vif e rev (genes acessórios). Como resultado houve uma redução da expressão desses genes nas células que receberam o vetor com o sgRNA. O grupo notou também, que os vetores cujo alvo eram as sequências de LTR foram mais efetivas do que outros, indicando a importância da expressão deste gene no ciclo de vida do vírus. Após este teste, CRISPR-Cas9 foi usado contra o DNA viral já integrado nas células hospedeiras. A carga viral destas células foi diminuída com a co-transfecção da Cas9 e dos sgRNAs anti-LTR, tornando a técnica um potencial tratamento para portadores do vírus.

Além destes avanços em terapia *ex vivo*, segundo Cyranoski, em 2016, cientistas chineses obtiveram aprovação ética para injetar, em humanos, células modificadas com a técnica do CRISPR-Cas9. O grupo que conseguiu esse marco é liderado pelo oncologista Lu You. Seu projeto abrangerá pacientes que tiveram câncer de pulmão com células metastáticas e que os tratamentos como quimioterapia, radioterapia e outros tratamentos falharam. Eles farão a extração de células do sistema imune dos participantes e farão a edição de genoma com o CRISPR-Cas9 tendo como alvo o gene que codifica a proteína PD-1, que normalmente checa a capacidade das células de ter uma resposta imune. As células editadas serão multiplicadas em laboratório e depois serão reintroduzidas na corrente sanguínea dos pacientes. A proposta é silenciar o gene para a proteína PD-1, mas também inclui silenciar um outro gene e adicionar um terceiro. A edição dessas células tem como expectativa inibir o gene da PD-1 com maior eficiência e, multiplicando as células, promover o gatilho para uma resposta do sistema imune contra tumores. Pesquisadores temem que a modificação nos linfócitos T e não nas células cancerígenas levem-nas a atacarem outros órgãos como o intestino, adrenais e outros tecidos saudáveis. Outros pesquisadores justificam que as células afetadas pelo tumor não estão acessíveis para tratamento. Os testes de fase I serão realizados com 3 diferentes regimes de dosagens, em dez pessoas, com aumento gradativo na dose, iniciando com um paciente que será monitorado de perto para efeitos adversos. Os pesquisadores também monitorarão marcadores no sangue dos pacientes para averiguar se o tratamento está funcionando.

Em 2017, o grupo de Xu usou a técnica do CRISPR para retirar o receptor CCR5, receptor de quimiocinas, em células humanas CD34+ HPSCs validando a técnica a longo prazo em ratos NOD/Prkdc^{scid}/IL-2Rγ^{null}. Usando sgRNA que possuía 17-18pb. Após teste em células *in vitro*, foi usada a sequência de sgRNA com maior especificidade e eficácia. Após a edição nas células CD34 + HPSCs (human pluripotent stem cells – células tronco humanas pluripotentes), estas foram transplantadas nos ratos resultando numa rápida e eficiente reconstituição em todos os animais. Após 30-47 semanas da reconstituição dos animais, a remoção do receptor CCR5 em média foi de 31,2%, consistente com o mesmo teste nas primeiras 12 semanas. Foi observado neste estudo que as células editadas humanas sofreram quimerismo com as células dos ratos e

apresentaram o genótipo com as alterações, além destas sofrerem diferenciação e maturação em outras células sanguíneas dos animais. Isto indicou que o tratamento com células editadas com o sistema CRISPR-Cas9 manteve atividade hematopoiética a longo termo, repopulando e diferenciando-se em todas as linhagens hematopoiéticas.

A última e não menos importante menção de terapia gênica com o CRISPR-Cas9 trata-se de um artigo recente, publicado em agosto de 2017. Segundo Biotec (2017) Ma e seu grupo, em 2017, utilizou a técnica do CRISPR-Cas9 para editar o gene MYBPC3 em embriões humanos, cuja mutação causa o espessamento do músculo cardíaco e gera a cardiomiopatia hipertrófica, principal causa de morte súbita em atletas jovens. Essa mutação é dominante, portanto basta que o embrião receba uma cópia do gene mutante de um dos pais para que ela se manifeste. Eles introduziram o CRISPR-Cas9 em oócitos saudáveis e os fertilizou com espermatozoides contendo a mutação no gene MYBP3. Dos 58 embriões fertilizados com a mutação, 42 foram editados com sucesso, mostrando uma grande eficiência da técnica. Porém, a dúvida sobre o artigo surge quando os próprios autores afirmam que em vez da substituição dos genes mutados, que foram clivados pela Cas9, ser feita com a fita molde inserida junto da maquinaria do CRISPR, parece que a correção da quebra foi feita com o gene materno que estava próximo a quebra. Esse acontecimento não foi observado em nenhum outro experimento com esta técnica que levou a outros cientistas a questionar se o reparo realmente ocorreu. Um grupo de 6 cientistas liderados por Egli publicou um artigo no mesmo ano sugerindo explicações para o fato observado pelo grupo de Ma em 2017. Dentre essas explicações, consta que logo após a fertilização do óvulo, os DNAs maternos e paternos não se encontram próximos o suficiente para interagirem ou compartilharem genes, não tendo como o DNA do oócito ter servido de molde para corrigir o gene defeituoso, porém é possível que alguns embriões não tenham recebido o DNA paterno e assim nunca herdaram a mutação, porque em alguns procedimentos de fertilização *in vitro*, alguns embriões podem começar a se desenvolver a partir apenas do DNA materno, caracterizando-se como partenogênese. Eles também afirmam que o grupo de Ma (2017) foi levado acreditar que a mutação foi corrigida porque os testes feitos não foram capazes de mostrar alguns outros possíveis resultados. O ensaio usado não foi capaz de detectar uma grande

deleção no gene paterno (que é muito comum em ensaios com a técnica do CRISPR-Cas9, incluindo a região onde o primer que foi usado para detectar a presença da sequência alvo se ligaria no teste. Eles detectaram apenas modificações na região alvo usando PCR e sequenciamento usando um primer que se liga a um local próximo aonde estaria a mutação, esperando que esse primer amplificasse a sequência do gene paterno mutado ou corrigido e esse primer também se ligaria ao DNA materno saudável. Após o sequenciamento desses DNAs eles poderiam ter duas sequências diferentes e saberiam que o gene paterno estava diferente do materno. Caso fosse encontrada apenas uma sequência significaria que os dois genes estavam iguais. Porém eles não previram que o CRISPR poderia cortar além da sequência alvo e acabaria deletando também o local onde o primer se ligaria ao DNA paterno e, assim, o primer não poderia amplificar o gene paterno. Logo, a única sequência observada veio apenas do DNA materno e este era saudável, fazendo-os crer que a mutação no gene paterno foi corrigida quando pode não ter sido (BIOTEC, 2017).

4.9 Outras aplicações do CRISPR-Cas9

4.9.1 Interferência e ativação por CRISPR

Em 2016 o grupo de Savidis usou a tecnologia CRISPR-Cas9 para descobrir quais proteínas humanas são necessárias para a replicação do ZIKA vírus (ZIKV), descoberta essencial para combater o vírus, seja por meio de vacinas ou outras terapias. Eles usaram CRISPR para clivar os genes que codificam algumas das proteínas que interagem com os vírus e inseriram nelas algumas mutações que tornariam essas proteína não funcionais. Esse experimento foi realizado contra diversas proteínas e quando o vírus não se replicou nas células H1-HeLa, eles notaram que elas eram essenciais para a sua replicação.

Existem diversas aplicações da dCas9, tal como a repressão/ativação de um gene. Ao se ligar ao DNA, a dCas9 reprime a transcrição desta região por impedimento estereoquímico da RNA polimerase, pois a dCas9 pode estar ligada a um domínio repressor sendo guiada até o local alvo pelo sgRNA e este domínio repressor irá se ligar a essa região alvo suprimindo genes específicos. Este uso da dCas9 recebe o nome de interferência pelo CRISPR. Entretanto, é possível ligar dCas9 a ativadores transcripcionais, obtendo-se ativação pelo CRISPR, cujo ativador será levado para a região alvo do DNA e a expressão deste gene será aumentada (RAMOS, 2016; BIOTEC, 2017).

Pode-se também fusioná-la com modificadores epigenéticos, como o VP64 ou KRAB, fazendo-a regular a ativação ou supressão do gene alvo, bloqueando fisicamente de se ligar aos fatores de transcrição. Porém esta regulação é baixa e varia bastante de acordo com sgRNA. Para se intensificar esta regulação pela dCas9, pode-se direcionar diferentes sgRNAs para múltiplos alvos no mesmo gene (RAMOS, 2016).

4.9.2 Correção de mutações de uma única base

A dCas9 também é usada para localizar um segmento do genoma com a ajuda do sgRNA ligado a ela, mas sem clivá-lo, podendo ligar à dCas9 uma outra proteína que também irá para o local alvo do DNA e a proteína pode ser uma enzima (deaminase) que é capaz de converter citosina em uracila e como as células leem uracila como timidina, a dCas9 pode ser usada para corrigir doenças causadas por mutações onde a timidina foi substituída por citosina (BIOTEC, 2017).

4.9.3 Localização in situ por CRISPR

Além das funções acima, a dCas9 também pode ser ligada à uma proteína fluorescente, como a EGFP (proteína verde fluorescente) e ser usada para localizar genes de interesse em células vivas. Esta técnica é conhecida como localização in situ, e ela torna possível acompanhar a movimentação do material genético ao longo das fases do ciclo celular. Para o uso da dCas9 em screening prefere-se poucos sgRNAs, pelo tamanho das bibliotecas (BIOTEC, 2017; NATUREVIDEOCHANNEL, 2017; RAMOS, 2016).

4.9.4 Aumento da transcrição genética por CRISPR

Ao desativar completamente a Cas9 para que ela não consiga mais cortar DNA é possível também adicionar fatores de transcrição à Cas9 fusionando-os diretamente ou por meio de adição de uma sequência de peptídeos e, assim, os ativadores são recrutados para o RNA guia. Os ativadores recrutam a maquinaria de transcrição da célula, trazendo a RNA polimerase e os outros fatores da transcrição para a sequência alvo aumentando a transcrição daquele gene alvo (NATUREVIDEOCHANNEL, 2017)

4.9.5 Evitar tradução do RNAm

Outro aperfeiçoamento feito na Cas9 possibilitou o seu uso em RNA também. Essa Cas9 é capaz de se ligar a RNAm evitando a sua tradução. Além de poder se ligar ao RNA ela é capaz de cortar o RNA como já ocorre nas bactérias (BIOTEC, 2017).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica CRISPR-Cas9 vem se mostrando uma potencial ferramenta de tratamento para as mais diversas doenças, devido à sua versatilidade, baixo custo, fácil design e manejo.

É uma tecnologia que está em constante aprimoramento e vemos a cada dia mais e mais estudos usando a técnica em células humanas ou em outros primatas.

Com os devidos ajustes e com os propósitos em prol do bem maior da sociedade será um excelente aliado nos mais diversos propósitos que excedem o básico do funcionamento de ferramenta de corte de DNA, como a visualização das células durante a divisão celular, silenciamento ou aumento da expressão de genes diversos dentre outras funcionalidades.

Além disso com a grande divulgação a técnica nos meios não acadêmicos, temos um aumento ainda maior em estudos em prol do CRISPR fortalecendo ainda mais a busca pelo conhecimento acerca dele.

REFERÊNCIAS

ADDGENE The nonprofit plasmid repositior, **Addgene**. Disponível em: <<https://www.addgene.org/crispr/guide/>> Acesso em 15 Dez 2016.

AL-ATTAR et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. **Biol. Chem.** Berlin, v. 392, n. 4, 277–289, julho, 2011. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/bchm.2011.392.issue-4/bc.2011.042/bc.2011.042.xml>>. Acesso em: 01 Jun 2016.

ARTIOLI et al. Terapia gênica, doping genético e esporte: fundamentação e implicações para o futuro. **Rev Bras Med Esporte**. São Paulo, v. 13, n. 5, p. 349-354, 2007. Disponível em <http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/marco2012/ciencias_artigos/16terapia_genica.pdf> Acesso em 24 fev 2017

BARRANGOU et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. **Science**. Nova York, n. 5819, v. 315, p. 1709-1712, 2007. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/315/5819/1709.full.pdf+html>>. Acesso em 30 Jun 2016.

BASSETT, A. R. et al. Highly Efficient Targeted Mutagenesis of Drosophila with the CRISPR/Cas9 System. **Cell Reports**, v. 4, n. 1, p. 220–228, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124713003124>> Acesso em 05 Abr 2018.

BASTIDA, Ángel Martín. CRISPR-Cas9 y ... ¿Bebés a la carta? **MoleQla: revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide**. Sevilla, n. 21, p. 8-11, 2016. Disponível em: <https://www.upo.es/moleqla/export/sites/moleqla/documentos/Numero21/Destacado_1.pdf> Acesso em: 01 Jun 2016.

CANTÃO, Natália Mirele. **Perfil de mutações e resistência do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) em pacientes coinfectados com o Vírus da Hepatite B (VHB)**. 2016. 57f. Dissertação (mestrado em Pesquisa e desenvolvimento: Biotecnologia Médica) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2016.

CYRANOSKI, David. First trial of CRISPR in people. **Nature**. v. 535, p. 476-477, 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/polopoly_fs/1.20302!/menu/main/topColumns/topLeftColumn/pdf/nature.2016.20302.pdf>. Acesso em 17 Nov 2016.

CAPLAN, A. L. et al. No time to waste--the ethical challenges created by CRISPR: CRISPR/Cas, being an efficient, simple, and cheap technology to edit the genome of any organism, raises many ethical and regulatory issues beyond the use to manipulate human germ line cells. **EMBO reports**, v. 16, n. 11, p. 1421–1426, Aug. 2015. Disponível em: <<http://embor.embopress.org/content/16/11/1421> > Acesso em: 15 Mar 2018.

COSTANZI-STRAUSS, Eugenia; STRAUSS, Bryan E. Perspectivas da terapia gênica. **Rev de Medicina**, São Paulo, v. 94, n. 4, p. 211-222, 2015. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/revistadc/article/view/108767>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

DELTCHEVA, E. et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. **Nature**, v. 471, n. 7340, p. 602–607, 2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature09886>> Acesso em 21 fev 2018.

DING, Q. et al. A TALEN Genome-Editing System for Generating Human Stem Cell-Based Disease Models. **Cell Stem Cell**, v. 12, n. 2, p. 238–251, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590912006455>>. Acesso em 01 Mar 2018.

DING et al. Permanent Alteration of PCSK9 With In Vivo CRISPR-Cas9 Genome Editing. **Circulation Research**. Dallas, v. 115, n. 5, p. 488-492, 2014. Disponível em: <http://circres.ahajournals.org/content/115/5/488.short>. Acesso em 02 set 2017.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1258096–1258096, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25430774>>. Acesso em: 01 Maio 2018.

EBINA, H. et al. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, 2013. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep02510>> Acesso em: 21 Maio 2017.

EGLI et al. Inter-homologue repair in fertilized human eggs? **bioRxiv**. v. 181255 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/181255>. Acesso em 15 Set 2017.

GAJ, T.; GERSBACH, C. A.; BARBAS, C. F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 7, p. 397–405, 2013. Disponível em: <[https://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799\(13\)00087-5](https://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799(13)00087-5)> Acesso em 15 Maio 2017.

GILBERT, L. A. et al. CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. **Cell**, v. 154, n. 2, p. 442–451, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23849981>> Acesso em 24 fev 2018.

GOLDIM, José Roberto. Genetics and ethics: a possible and necessary dialogue. **J Community Genet**. Porto Alegre, v. 6, n. 3, p. 193-196, 2015. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/s12687-015-0232-6>> Acesso em 01 Jun 2016.

GORI, J. L. et al. Delivery and Specificity of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technologies for Human Gene Therapy. **Human Gene Therapy**, v. 26, n. 7, p. 443–451, 2015. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/hum.2015.074>> Acesso em 15 fev 2018.

GOULART, Ana Emília. **Impactos do silenciamento do RNA não codificante PCA3 em células de câncer de próstata**. 2014. 92f. Dissertação (Mestrado em Oncologia) - Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer Coordenação de Pós-graduação, Rio de Janeiro, 2014.

GOYAL et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by Spoligotyping and IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism. **J. Clin.**

Microbiol. London, v. 35, n. 3, p. 647–651, 1997. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/35/3/647.short>> Acesso em 08 out 2016.

GROENEN et al. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. **Molecular Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 1057-1065, 1993. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00976.x/full>> Acesso em 05 de out 2016.

HAFT, D. H. et al. A Guild of 45 CRISPR-Associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes. **PLoS Computational Biology**, v. 1, n. 6, 2005. Disponível em: <<http://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.0010060>> Acesso em 03 fev 2017.

HANSEN et al. Genome Editing with CompoZr Custom Zinc Finger Nucleases (ZFNs). **J. Vis. Exp.** v. 64, n. 3304, p. 1-7, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3476380/>> Acesso em 18 abr 2017.

HILLE, F. et al. The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. **Cell**, v. 172, n. 6, p. 1239–1259, 2018. Disponível em <[https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(17\)31383-1](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(17)31383-1)> Acesso em 20 Abr 2018.

HUTCHINSON, J. The biology and evolution of HIV. *Annu. Rev. Anthropol.* Texas, v. 30, p. 85-108, 2001. Disponível em:<<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.anthro.30.1.85?journalCode=anthro>>. Acesso em 30 Jun 2016.

INSTANTE BIOTEC. **Embrião humano foi mesmo editado? | #InstanteBiotec 43** Brasil, 2017. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=1NM9VUkP9lQ>. Acesso em 25 Set 2017.

INSTANTE BIOTEC. **Devemos modificar o genoma de embriões? | #InstanteBiotec 28** Brasil, 2016. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=W8OFiGiKeZw> > Acesso em 10 Set 2017

ISHINO et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **J. Bacteriol.** Osaka, v. 169, n. 12, p. 5429–5433, 1987. Disponível em: <http://jb.asm.org/content/169/12/5429.short> > Acesso em 20 mar 2017.

JANSEN, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Molecular Microbiology**. Holanda, v. 43, n. 6, p. 1565-1575, 2002. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x/abstract> > Acesso em 30 Jun 2016.

JAO, L.-E.; WENTE, S. R.; CHEN, W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 34, p. 13904–13909, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23918387> > Acesso em 01 junho 2016.

JINEK, M. et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 2012.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22745249>> Acesso em 23 abr 2017

KIM, S. et al. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. **Genome Research**, v. 24, n. 6, p. 1012–1019, Feb. 2014. Disponível em: <<https://genome.cshlp.org/content/24/6/1012>> Acesso em 16 Mar 2018.

LIAO et al. Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. **Nature**. v.6, n. 6413, p. 1-10, 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ncomms7413>>. Acesso em 10 jan 2017.

Lipofection. Disponível em: <<https://www.ozbiosciences.com/content/14-Lipofection-liposomal-transfection-delivery-system>> Acesso em: 02 Jan 2018.

LOURENÇO, Ana Margarida Martins Gonçalves. Imunidade celular: caracterização das proteínas celulares que inibem a infecção viral. 2016. 74f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) - Instituto Superior De Ciências Da Saúde Egas Moniz, Portugal, 2016

MA, Y. et al. Heritable Multiplex Genetic Engineering in Rats Using CRISPR/Cas9. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, May 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24598943>> Acesso em 01 junho de 2016.

MA et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. **Nature**. v. 548, p. 413-419, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature23305>. Acesso em 15 Set 2017.

MAKAROVA et al. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. **Biology Direct**, Texas, v. 1, n. 7, p. 1-26, 2006. Disponível em: <<https://biologydirect.biomedcentral.com/articles/10.1186/1745-6150-1-7>> Acesso em 07 jun 2017.

MOJICA et al. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. **Mol. Microbiol.** San Vicente, v.17, n. 1, p. 85–93, 1995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7476211>> Acesso em 21 mar 2017.

MOJICA et al., Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. **Molecular Microbiology** Espanha, V. 36, n. 1, p. 244-246, 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x/abstract;jsessionid=18F0018DA3122971F5DA5103AC4AB9B8.f04t04>> Acesso em 30 Jun 2016.

MOJICA et al. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. **J Mol Evol**, San Vicente, v. 60, n. 1, p. 174-182, 2005. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00239-004-0046-3#citeas>> Acesso em 21 mar 2017.

NABAIS, Ana Teresa Gaspar. **Técnicas De Edição De Genoma Como Abordagem Promissora Para A Terapia Génica**. 2015. 69f. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas) - Instituto Superior De Ciências Da Saúde Egas Moniz, Portugal, 2015.

NATUREVIDEOCHANNEL. **CRISPR: Gene editing and beyond**. 2017. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=4YKFW2KZA5o>> Acesso em 05 Mar 2018.

NERY, Laura Roesler. **Caracterização de Modelos de Experimentação Baseados na Doença de Alzheimer em Zebrafish**. 2015. 84f. Dissertação (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil, 2015.

POURCEL, C; SALVIGNOL, G; VERGNAUD, G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. **Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 653–663, Jan. 2005. Disponível em: <<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.27437-0>> Acesso em 18 Jun 2017.

RAMOS, António David Rufino. **CRISPR/Cas9: uma ferramenta de edição genética para investigação e novas terapias**. 2016. 31f. Dissertação (Mestrado em ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Portugal, 2016

RAMAKRISHNA, S. et al. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. **Genome Research**, v. 24, n. 6, p. 1020–

1027, Feb. 2014. Disponível em:
<https://genome.cshlp.org/content/24/6/1020.abstract> > Acesso em 13 Jan 2018.

SCHWANK, G. et al. Functional Repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in Intestinal Stem Cell Organoids of Cystic Fibrosis Patients. **Cell Stem Cell**, v. 13, n. 6, p. 653–658, 2013. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590913004931> Acesso em 04 Abr 2018.

SHAFIE et al. The CRISPR-Cas9 System: A New Dawn in Gene Editing. **Bioanalysis & Biomedicine**. Malásia, v. 6, n. 6, p. 45-48, 2014. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.4172/1948-593X.1000109> > Acesso em 01 Jun 2016.

SHEN, B. et al. Efficient Gene Disruption in Diverse Strains of *Toxoplasma gondii* Using CRISPR/CAS9. **mBio**, v. 5, n. 3, 2014. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24825012>> Acesso em 01 junho 2016

STERNBERG, S. H. et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. **Nature**, v. 507, n. 7490, p. 62–67, 2014. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24476820> > Acesso em 02 fev 2018.

SUNG, Y. H. et al. Highly efficient gene knockout in mice and zebrafish with RNA-guided endonucleases. **Genome Research**, v. 24, n. 1, p. 125–131, 2013. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24253447> > Acesso em 01 junho 2016.

VASCONCELOS, Maria José Vilaça de; FIGUEIREDO, José Edson Fontes. **TALEN uma ferramenta na edição de genomas**. Ed. 21. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, p. 1-22, 2015 Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1037915> > Acesso em 01 Maio 2018.

VASCONCELOS, Maria José Vilaça de; FIGUEIREDO, José Edson Fontes. **Edição de Genoma com Nuclease “Zinc Finger”**. Ed. 21. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, p. 1-36, 2016 Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1059977/1/doc201.pdf>> Acesso em 19 abr 2017.

XIE et al. Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. **Cold Spring Harbor Laboratory**. California, v. 27, n. 10, p. 1526-1533, 2014. Disponível em: <http://genome.cshlp.org/content/24/9/1526.full.pdf+html>. Acesso em 30 ago 2017

XU et al. CRISPR/Cas9-Mediated CCR5 Ablation in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Confers HIV-1 Resistance In Vivo. *Molecular Therapy*. V. 28, n. 8, p. 1-8, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28527722>> Acesso em 01 Set 2017.

WANG, H. et al. One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. **Cell**, v. 153, n. 4, p. 910–918, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23643243> > Acesso em 01 junho 2016.

WU et al. Correction of a Genetic Disease in Mouse via Use of CRISPR-Cas9. **Cell Stem Cell**. Shanghai, v. 13, n. 6, p. 659–662, 2013. Disponível em: <[http://www.cell.com/cell-stem-cell/fulltext/S1934-5909\(13\)00462-1](http://www.cell.com/cell-stem-cell/fulltext/S1934-5909(13)00462-1)> Acesso em 30 ago 2017.

YIN et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. **Nature Biotechnology**. v. 32, p. 551–553, 2014. Disponível em: <http://www.nature.com/nbt/journal/v32/n6/full/nbt.2884.html?foxtrotcallback=true> . Acesso em 02 set 2017.

ZHEN, S. et al. In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by CRISPR/Cas9. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 450, n. 4, p. 1422–1426, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X14012285>> Acesso em 30 de abril 2017.