

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

CURSO DE BIOMEDICINA

LUIZ FERNANDO NASCIMENTO MICHELS

A REVOLUÇÃO DA EDIÇÃO GENÔMICA COM O SISTEMA CRISPR-CAS

CRICIÚMA

2017

LUIZ FERNANDO NASCIMENTO MICHELS

A REVOLUÇÃO DA EDIÇÃO GENÔMICA COM O SISTEMA CRISPR-CAS

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado para
obtenção do grau de bacharel em Biomedicina pela
Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Rohr

CRICIÚMA

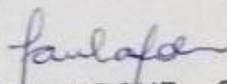
LUIZ FERNANDO NASCIMENTO MICHELS

A REVOLUÇÃO DA EDIÇÃO GENÔMICA COM O SISTEMA CRISPR-CAS

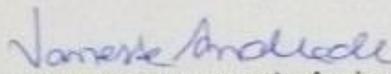
Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora para obtenção do Grau de Bacharel no Curso de Biomedicina da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Criciúma, Junho de 2017.

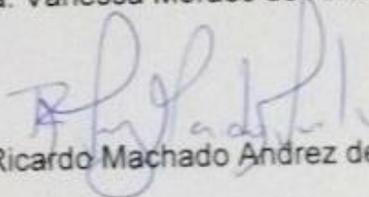
BANCA EXAMINADORA



DRA. PAULA ROHR – Orientadora



Dra. Vanessa Moraes de Andrade



Dr. Ricardo Machado Andrez de Ávila

AGRADECIMENTOS

Faço uso desses poucos parágrafos para prestar minha gratidão a todos que de uma forma ou outra me deram forças para que eu tenha chego até aqui, e brevemente, tenha concluído essa etapa incrível e com muita evolução de minha vida.

Agradeço primeiramente a minha família, aqueles que sempre me apoiaram em minhas escolhas e decisões, sempre acreditaram em meus sonhos e potencial e são meu porto seguro.

À minha querida e atenciosa professora e orientadora Paula, que me transmitiu a sapiência necessária para que fizesse esse trabalho.

A muitos dos meus professores durante a graduação, amantes do ensinar, os quais me fizeram entender um pouco mais da vida em sua essência, e a mim passaram saberes que levarei para além de minha profissão.

Aos meus amigos colegas, os quais tornaram esses anos de estudo infinitamente divertidos e repletos de companherismo. Esse parágrafo é de vocês, miga Alice, miga Bru, miga Diene, miga Elisa, miga Eve, miga Gabi, migo Gui, miga Mari e miga Thays.

Às minhas amigas que me conhecem a tanto tempo, aquelas com que tenho uma amizade que por motivos que só nós entendemos, é especial, tem um “novo estilo”. Elas me viram mudar tanto... e sempre estiveram do meu lado, mesmo que nossas vidas as vezes tomassem caminhos um pouco diferentes. Esse parágrafo é de vocês, Mands, Joanix e Karolis.

Ao meu grande amigo Jorge, cuja amizade, creio que já estava escrita em nossos destinos. Aquele com que me aventurei tanto, que é até cômico e fico imaginando como estamos inteiros até hoje.

Aos meus demais amigos, que tenham certeza, que se os chamo por essa palavra, foram especiais para mim em algum momento.

À Unesc, que deu toda a estrutura para minha formação.

Por fim, agradeço aqueles que se propuseram a abrir a caixa de pandora do conhecimento e entender a natureza nobre e pura da ciência, muitas vezes deturpada pela ganância e ego humanos.

“A satisfação da própria curiosidade é uma das maiores fontes de felicidade na vida”

(Linus Pauling)

RESUMO

Desde a descoberta dos ácidos nucleicos e suas funções, tecnologias para a manipulação do material genético possibilitaram grandes avanços na biologia. No início dos anos 2000 fora descoberto em procariotos uma espécie de sistema imune adquirido mediado pelo sistema CRISPR-Cas, acrônimo para *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* - (repetições palindrômicas curtas regularmente inter espaçadas agrupadas, e proteínas Cas), que consiste em sequências derivadas de bacteriófagos ou plamídeos invasores que são incorporados ao genoma procarioto e expressos juntamente de endonucleases capazes de clivar a sequência correspondente em posterior infecção. Recentemente, um tipo de sistema CRISPR-Cas foi modificado para ser usado como uma plataforma de edição genômica programável em quaisquer células vivas, para quase qualquer gene, se demonstrando mais eficás, de menor custo e complexidade comparado a outras técnicas já existentes. Partindo do princípio da versatilidade do uso do sistema CRISPR-Cas dentro da edição genômica, esta revisão bibliográfica buscará expor importantes estudos já realizados utilizando tal técnica, dentro de algumas áreas de interesse biomédico e biotecnológico, como doenças genéticas, infecções virais, edição em plantas e criação de modelos animais e discutir particularidades de cada experimento, como meios de entrega do sistema às células e sequências-alvo utilizadas, além de perspectivas do uso da técnica.

Palavras-chave: CRISPR-Cas. Edição genômica. Cas9. sgRNA.

ABSTRACT

Since the discovery of nucleic acids and their functions, technologies for manipulating genetic material made great advances possible in biology. In the early 2000s immune system like cellular machinery was discovered in prokaryotes, which was acquired through the CRISPR-Cas system, an acronym for clustered regularly interspaced short palindromic repeats and Cas protein, which consists of sequences derived from bacteriophages or invading plasmids which are incorporated into the prokaryotic genome and expressed together with endonucleases which are capable of cleaving the corresponding sequence in a subsequent infection. Recently, a type of CRISPR-Cas system has been modified to be used as a programmable genomic editing platform in any living cells, for almost any gene, demonstrating more efficiency, lower cost and complexity compared to other existing techniques. Based on the versatility of the CRISPR-Cas system within genomic edition, this review will seek to present important studies already carried out using this technique within some areas of biomedical and biotechnological interest, such as genetic diseases, viral infections and animal modeling, discussing particularities of each experiemnt such as the means of delivering the system to the cells and target sequences used, as well as prospective uses of the technique.

Keywords: CRISPR-Cas. Genomic editing. Ca9. sgRNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquematização do processo de defesa bacteriano pelo sistema CRISPR-Cas9.....	18
Figura 2 - Fases de expressão e interferência nos tipos de sistemas CRISPR-Cas9.....	19
Figura 3 - Esquematização dos loci cas e CRISPR de <i>Streptococcus pyogenes</i> e funcionamento de um Sistema CRISPR-Cas9.....	21

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BSCTV - Beet curly top virus (vírus do broto crespo da beterraba)

cccDNA – Covalently closed circular DNA (DNA circular fechado covalentemente)

CEM - CRISPR escape mutants (mutantes de escape de CRISPR)

CRISPR- Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (repetições palindrômicas interespaçadas agrupadas)

crRNA – Crispr RNA (RNA crispr)

DH –Doeça de huntington

DNA - Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

dsRNA – Double stand RNA (RNA fita dupla)

GFP – Green fluorescent protein (proteína fluorescente verde)

HbA – Hemoglobina A

HbA2 – Hemoglobina A2

HbF – Hemoglobina fetal

HbS – Hemoglobina S

HBV – Hepatitis B virus (Vírus da hepatite B)

HIV – Human immunodeficiency virus (vírus da imunodeficiência humana)

HPV – Human papillomavirus (vírus do papiloma humano)

HSV – Herpes simplex virus (vírus da herpes simples)

INTR – Inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa

NHEJ – Nonhomologous end joining (reparo de recombinação não homologa)

PAM – Protospacer adjacent motif (motivo adjacente ao protoespaçador)

PDAC – Pancreatic ductal adenocarcinoma (adenocarcinoma ductal pancreático)

PKU Phenylketonuria (fenilcetonúria)

PNA – Peptide nucleic acids (ácido nucleico peptídico)

RNA – Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)

RP – Retinite pigmentosa

sgRNA – Single guide RNA (RNA guia)

SNP – Single nucleotide polymorphism (polimorfismo de nucleotídeo único)

ssODN – Single strand oligodeoxynucleotides (oligodesoxinucleotídeos de fita simples)

ssRNA – Single strand RNA (RNA fita simples)

TALEN – Transcription activator like effector nuclease (Nuclease efetora semelhante à ativadores de transcrição)

tracrRNA – Trans-activating RNA de ativação em trans

TYLCV - Tomato yellow leaf curl virus (vírus do frisado amarelo do tomateiro)

vWF – Von Willebrand factor (fator de von Willebrand)

ZFN – Zinc finger nuclease (nuclease dedo de zinco)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVO GERAL	14
3 MÉTODOS	15
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
4.1 O QUE É UM SISTEMA CRISPR-CAS	17
4.2 INFECÇÕES VIRAIS.....	22
4.2.1 Hepatite B.....	22
4.2.2 Vírus da imunodeficiência humana (HIV)	29
4.2.3 Vírus do papiloma humano (HPV).....	36
4.2.4 Vírus da herpes simples (HSV)	40
4.3 DOENÇAS GENÉTICAS	42
4.3.1 Anemia falciforme	43
4.3.2 Retinite pigmentosa	46
4.3.3 Distrofia muscular de Duchenne	48
4.3.4 Fenilcetonúria.....	49
4.3.5 Doença de Huntington	50
4.4 EDIÇÃO EM PLANTAS	52
4.5 CRIAÇÃO DE ORGANISMOS MODELOS E LINHAGENS CELULARES	55
4.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	63
5. CONCLUSÃO	64
6. REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

Desde a descoberta da estrutura molecular do DNA, tecnologias para a manipulação do material genético possibilitaram grandes avanços na biologia. Até então, métodos para promover modificações específicas nos nucleotídeos do genoma de organismos eram elusivos (DOUDNA e CHARPENTIER, 2014).

As primeiras abordagens do que atualmente é chamado de edição genômica baseavam-se no princípio do reconhecimento de posições específicas do DNA. Os estudos das vias de reparo e recombinação do DNA mostraram que as células possuem um maquinário para reparar quebras de fita dupla que poderiam causar dano as mesmas, ou seja, constatou-se que era possível executar uma alteração por clivagem numa sequência-alvo específica. Isso tornou-se de grande interesse como possível estratégia na engenharia genômica (RUDIN, SUGARMAN e HABER, 1989; PLESSIS et al., 1992; ROUET, SMIH e JASIN, 1994; CHOULIKA et al., 1995).

Segundo CHOULIKA et al (1995) uma das primeiras técnicas usadas para tal fim, foi a utilização da endonuclease mitocondrial I-SceI da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Tal proteína tem como função realizar *intron homing* no DNA mitocondrial, para isso a I-SceI realiza uma quebra de fita dupla, após reconhecer uma sequência de 18 pb, conferindo especificidade a ação enzimática. Constatou-se que se podia usar a I-SceI para promover uma quebra de fita dupla em DNA cromossômico mamífero, e essa, por sua vez, podia ser reparada com uma molécula de doação homóloga a região clivada.

A princípio, alguns estudos utilizavam oligonucleotídeos ligados à substâncias com atividade de clivagem como a bleomicina e psoraleno para o reconhecimento de pares de base e posterior modificação cromossômica em células mamíferas. De maneira similar alguns testes foram realizados com ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) e poliamidas também ligados a bleomicina, além de íntrons *self-splicing*. Tais abordagens não levaram a resultados robustos mas provaram a utilidade de pareamento de bases na edição genômica (SANDOR e BREDBERG, 1995; CHO, PARKS e DERVAN, 1995).

Para Sontheimer e Barrangou (2015), muito do que se pesquisa atualmente sobre procariotos se iniciou em relação a sua patogenicidade a humanos e outros animais, fazendo que muitos esqueçam os avanços na pesquisa biomédica que somente aconteceram graças a ferramentas bioquímicas contidas nesses seres. Um grande “presente” dado a nós pelas bactérias recentemente, foi seu sistema imune adquirido mediado pelo sistema CRISPR-Cas, acrônimo para *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* - (repetições palindrômicas curtas regularmente interespaçadas agrupadas), e proteínas Cas, que pode ser usado como uma plataforma de edição genômica programável em quaisquer células vivas.

No início dos anos 2000, laboratórios de bioinformática e microbiologia começaram a estudar as sequências CRISPRs no genoma de procariotos (DOUDNA e CHARPENTIER, 2014). O primeiro locus CRISPR foi encontrado em uma cepa K12 de *Escherichia coli* já em 1987, por cientistas japoneses. Loci CRISPR se mostra presente em 84% das arqueas e 45% das bactérias de acordo com dados do *database* CRISPRdb da Universidade Paris-Sul. (SONTHEIMER e BARRANGOU, 2015; RATH et al., 2015). Conforme estatística do site PubMed, entre 2007 e 2012, a cada 20 meses o número de artigos publicados contendo o termo “CRISPR” duplicava (LEVIN, 2015).

A introdução de mudanças em sequências-alvo de genomas de células vivas e organismos cada vez mais se tornam grandes ferramentas para a pesquisa em áreas da biologia, biomedicina e biotecnologia, sendo um caminho promissor para, por exemplo, o tratamento de doenças genéticas, melhoramento genético em animais de pecurária e plantas utilizadas na agricultura. Versões adaptadas do sistema CRISPR-Cas tipo II vêm sendo usadas para tais fins nos últimos anos em diversos estudos, obtendo-se resultados com relativo sucesso, mesmo estando essa tecnologia ainda em sua fase experimental (SANDER e JOUNG, 2014).

Para Rath et al (2015), de um modo simplificado, CRISPR é um arranjo de pequenas sequências repetidas com espaçadores de sequências diferentes, podendo ser observado tanto em DNA cromossômico, quanto em plasmídeos. Os espaçadores são geralmente provenientes de genomas virais ou plasmidiais, ou seja, novos vírus podem ser reconhecidos pelo sistema CRISPR-Cas quando um novo espaçador é

inserido no genoma bacteriano, sendo essa alteração transmitida a prole. Os espaçadores são inseridos de um único lado do lócus CRISPR, ou seja, o sistema serve como um arquivo cronológico dos vírus e plasmídeos que a célula bacteriana e sua progenitora encontraram. A atividade CRISPR requer um conjunto de genes associados a CRISPR, chamados de *cas*.

Diferentemente de outras técnicas de engenharia genômica, a especificidade de sequência-alvo conferida ao sistema CRISPR-Cas é obtida por uma pequena molécula de RNA, ao contrário de proteínas projetadas para cada edição específica. Isto torna tal técnica menos laborosa e de menor complexidade, facilitando a realização de pesquisas (POLSTEIN e GERSBACH, 2015).

Os sistemas CRISPR-Cas são diversificados tanto em relação a estrutura quanto a função e o mecanismo de ação. Mesmo com a diversidade, os loci CRISPR compartilham a mesma organização, contendo curtas repetições diretas de 30 a 40 pb, separados uns dos outros por espaçadores derivados de invasores não-repetitivos, de comprimento semelhante. Esse arranjo é acompanhado por uma sequência “líder” que na maioria dos casos inclui uma região promotora que inicia a transcrição unidirecional através das repetições de CRISPR e espaçadores (SONTHEIMER e BARRANGOU, 2015).

O fato dos loci CRISPR serem transcritos e de genes *cas* codificarem proteínas com domínios nuclease e helicase que se associavam as CRISPRs, gerou a teoria sobre a natureza essencial dos sistemas CRISPR-Cas como fontes de imunidade adquirida para procariotos contra bacteriófagos e plasmídeos, que foram comprovadas em 2007 (BARRANGOU et al., 2007). Os principais genes *cas* são caracterizados pela sua proximidade aos loci CRISPR (OSTRIA-HERNÁNDEZ et al., 2015).

Segundo Ostría-Hernández et al (2015), a habilidade das bactérias de se adaptarem a novos ambientes se dá em grande parte pela aquisição de plasmídeos pela transferencial horizontal de genes, contudo isso deve ocorrer de forma balanceada a fim de que a bactéria em questão não adquira novos elementos genéticos que aumentem seu gasto energético excessivamente para a manutenção do mesmo. Quando procariotos apresentam o sistema CRISPR-Cas em seu genoma, estes

organismos conseguem sobreviver a infecção inicial por fagos ou plasmídeos, devido a capacidade de obter um pequeno fragmento de DNA ou RNA invasor e, assim iniciar o maquinário celular para degradá-los. Desta forma, quando o material genético invasor é danoso, um sistema CRISPR-Cas representa uma vantagem seletiva, todavia quando plasmídeos concedem, por exemplo, resistência a antibióticos, tal inibição pode representar uma grande desvantagem.

O processo de defesa bacteriano pelo sistema CRISPR-Cas pode ser dividido em três etapas. Na primeira, a adaptação, quando há a inserção de novos espaçadores no locus CRISPR. Na segunda etapa ocorre a expressão dos genes cas e transcrição do locus CRISPR num RNA CRISPR precursor (pre-crRNA), que irá ser maturado em crRNA por proteínas Cas e fatores acessórios. Na terceira e última etapa, os ácidos nucleicos compatíveis com os espaçadores são reconhecidos e destruídos pela ação em conjunto do crRNA e proteínas Cas. O processo é esquematizado na figura 1. (RATH et al., 2015).

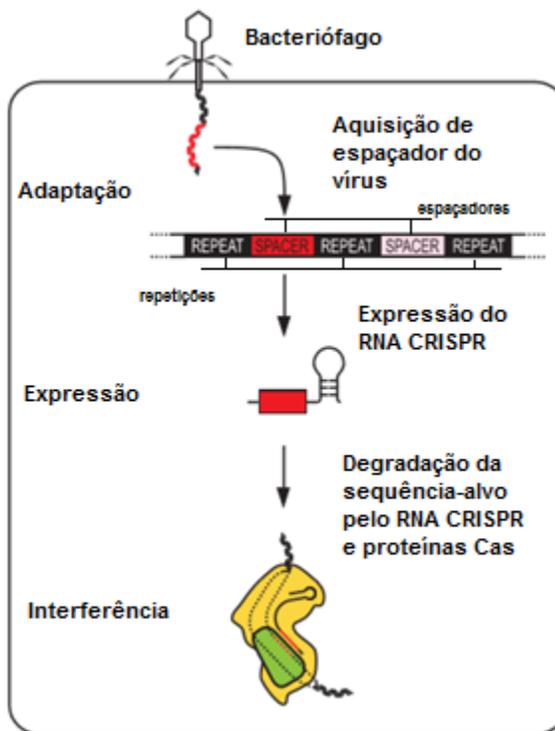


Figura 1: Esquematização do processo de defesa bacteriano pelo sistema CRISPR-Cas9.

De acordo com Levin et al (2013), os fagos podem evadir esse mecanismo de defesa das bactérias, gerando CRISPR Escape Mutants (CEM) modificando a sequência de DNA dos espaçadores ou Motivos Adjacentes ao Protoespaçador (PAMs), como as proteínas Cas estão envolvidas nesses processos, há uma grande diversidade genética nos sistemas CRISPR-Cas entre bactérias e arqueas. Foi demonstrado também que fagos conseguem replicar em populações de bactérias com apenas um espaçador que os tem como alvo.

A maioria dos sistemas CRISPR-Cas podem ser categorizados em três tipos. A fase de adaptação é praticamente idêntica nos 3 tipos, quando as proteínas Cas1 e Cas2 reconhecem o material genético invasor. Já o processamento do crRNA e interferência ocorrem de maneira distinta entre os três principais tipos. Nos sistemas tipo I, as proteínas Cas6e e Cas6f clivam a junção de RNA fita simples (ssRNA) e RNA fita dupla (dsRNA) formadas por grampos do pre-crRNA, nos do tipo II, um RNA de ativação em trans (tracrRNA) é utilizado para produzir crRNAs, sendo clivado pela Cas9 e RNase III, já nos do tipo III o pre-crRNA é processado pela Cas6, não havendo necessidade de formação de grampos. Nos tipos II e III um processamento secundário ocorre. CrRNAs maduros se associam a proteínas Cas para formar os complexos de interferência, no tipo I o crRNA se associa a um complexo de ribonucleoproteínas chamado Cascade (CRISPR-associated complex for antiviral defense – Complexo de defesa antiviral associado a CRISPR), no tipo II a Cas9, no tipo III-A a Csm e tipo III-B a Csr. A clivagem da sequência-alvo é feita pelo próprio complexo no tipo II e III-B, e provavelmente pelo recrutamento da Cas3 no tipo I e Csm6 no tipo III-A. Contudo, existem variações do sistema CRISPR-Cas que não são classificados dentro desses tipos descritos. (MAKAROVA et al. 2011; WESTRA et al. 2014). Essa diferenciação entre os tipos de sistema CRISPR-Cas é esquematizada na figura 2

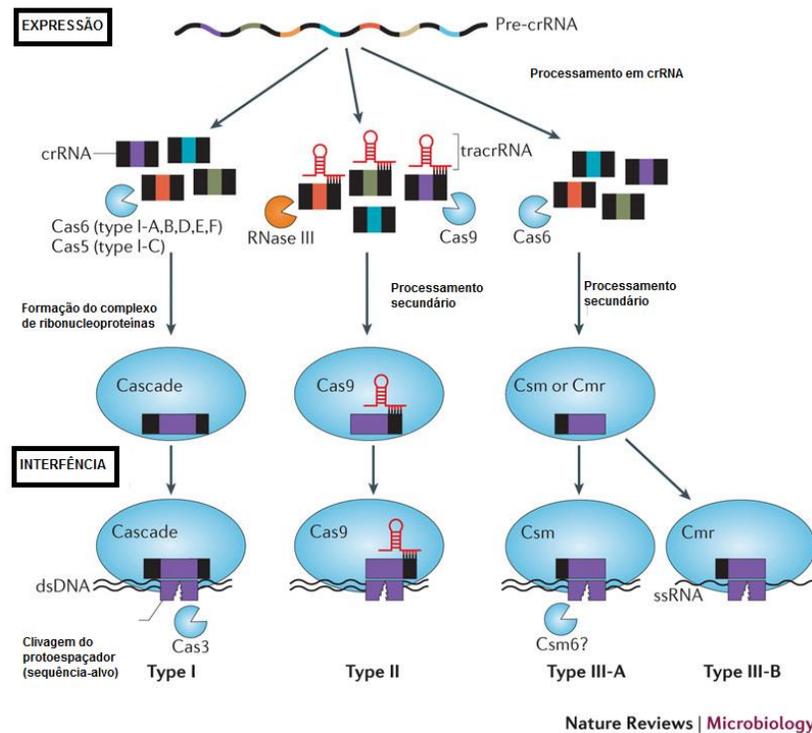


Figura 2: Fases de expressão e interferência nos tipos de sistemas CRISPR-Cas9

Fonte: Westra, Buckling e Fineran (2014)

Em 2012, um grupo de pesquisa liderados por Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna adaptaram um sistema CRISPR-Cas tipo II de *Streptococcus pyogenes* para edição gênica. Com a fusão do crRNA com o tracrRNA, houve a geração do single guide RNA (sgRNA), que recruta a proteína Cas9 para lugares específicos no genoma por pareamento de bases (JINEK et al. 2012).

Um sistema CRISPR-Cas tipo II é composto por um duplo complexo da endonuclease Cas guiada por RNA que tem a capacidade de clivagem de uma sequência específica de ácido nucléico. No sistema tipo II, a proteína Cas9 reconhece um complexo de RNA CRISPR (crRNA) de 42 nucleotídeos, que confere especificidade de DNA por pareamento de bases, e um crRNA de ativação em trans (tracrRNA) que se liga ao crRNA. Essa molécula dupla de RNA se liga a proteína Cas9, que é capaz de clivar a dupla hélice de DNA. Todavia a ação da Cas9 só acontece quando a sequência-alvo (também chamada de protoespaçador) está ao lado de um PAM, que é uma pequena sequência que indentifica a sequência-alvo e evita que a o sistema

CRISPR-Cas9 tenha atividade off-target. (RAHDAR et al., 2015). Segundo Savic e Schwank (2015), a criação de quebras de dupla fita pelo complexo CRISPR/Cas9 leva à edição genômica por dois mecanismos. Primeiramente, na ausência de um template de DNA homólogo, essas rupturas podem ser reparadas pelo sistema de reparo de recombinação não homóloga (*non-homologous end joining* – NHEJ), que é propensa a erro, podendo causar pequenas deleções e inserções, dessa forma inativando o gene alvo. Em segundo, na presença de um template de reparo sintético, a ruptura pode ser reparada com mudanças nos pares de base desejados. Na figura 3 é esquematizado o funcionamento de um sistema CRISPR-Cas tipo 3.

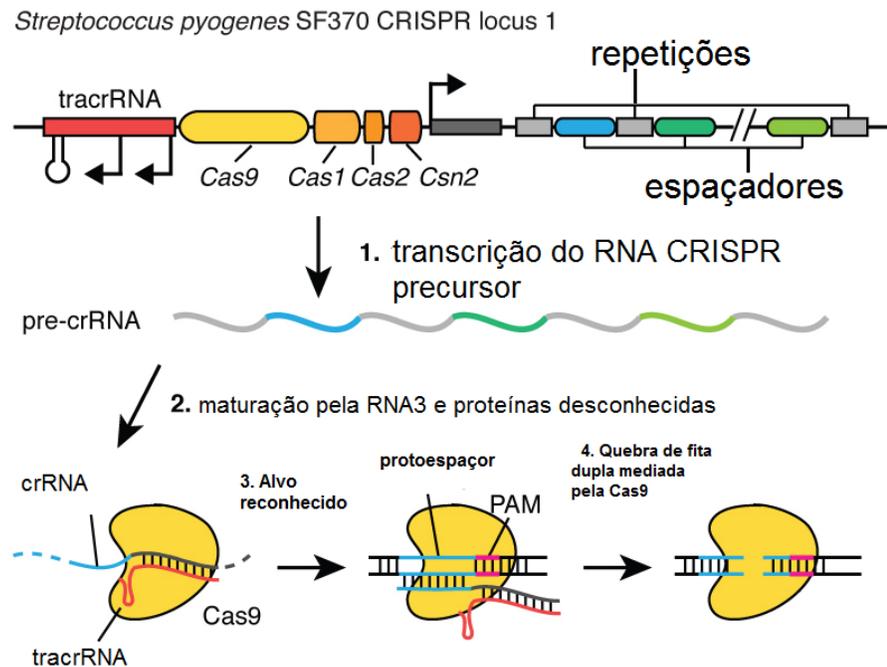


Figura 3: Esquematização dos loci cas e CRISPR de *Streptococcus pyogenes* e funcionamento de um Sistema CRISPR-Cas9

Fonte: Université d'Angers (2017)

Em questões de extensão, o genoma de eucariotos é incomparavelmente maior que o de um procaríoto, proporcionando uma grande chance de haver sequências

semelhantes ao protoespaçor, resultando numa atividade off-target da Cas9. A especificidade da nuclease Cas9 em células mamíferas continua como uma grande fonte de preocupação no uso do sistema CRISPR-Cas para fins clínicos e terapêuticos. Todavia, estudos demonstram que quando um pareamento de bases errôneo acontece, a clivagem enzimática por vezes não acontece, e que a atividade off-target depende do gene alvo, da sequência do sgRNA desenvolvida, tipo celular, contexto da sequência genômica e seu estado epigenético. (DOMINGUEZ, LIM e QI, 2015)

Outra questão importante quando se fala em especificidade da Cas9 é o fato da necessidade de uma sequência PAM reconhecível por tal nuclease adjacente à sequência-alvo, o que pode limitar a gama de genes editáveis pela técnica. Porém, em 2015, Kleinstiver e colaboradores alteraram a Cas9 de *Streptococcus pyogenes* selvagem (spCas9) para reconhecer PAMs alternativos utilizando informação estrutural, sistemas de seleção bacteriana e design combinatorial, desta forma permitindo uma robusta edição em genes endogenos de células humanas e de zebra fish, antes não editáveis pela spCas9 original. (KLEINSTIVER et al., 2015)

O sistema CRISPR-Cas9 tem vantagens sobre outras nucleases projetadas como a Nuclease Dedo de Zinco (ZFN) e Nucleases Efetoras Semelhantes à Ativadores de Transcrição (TALENs) pela fato de ser relativamente fácil de usar, de baixo custo, capacidade de multiplexação e melhor atividade de clivagem on-target. (MALI et al., 2013; CARROL, 2014).

Ao contrário da CRISPR, TALEN e ZNFs têm seu uso muito limitado, pois projetar e criar proteínas que se ligam a sequências específicas do DNA costumam muito tempo e tais técnicas são mais dificultosas no geral (SAVIC e SCHWANK, 2015).

Partindo do princípio da versatilidade do uso do sistema CRISPR-Cas dentro da edição genômica, esta revisão bibliográfica buscou expor importantes estudos já realizados utilizando tal técnica, dentro de áreas temáticas mais proeminentes, afim de elucidar o potencial e perspectivas da mesma.

2. OBJETIVO GERAL

Realizar uma revisão, agregando e sintetizando estudos relevantes realizados com a utilização do sistema CRISPR-Cas9, e, desta forma, apresentar as principais aplicações deste sistema em áreas biomédicas e biotecnológicas desenvolvidas no período entre os anos 2012 a 2017.

3. MÉTODOS

Os artigos foram selecionados com a utilização dos sites de busca *PubMed* e *ScienceDirect* a partir do termo “CRISPR” isoladamente, como também em combinação com os termos “disease”, “plants”, “virus”, “model”, “cancer” e “stem cells”. A seleção dos artigos levou em consideração o *ranking* obtido através da pesquisa por revelância, que considera o número de citações de cada artigo.

Foram incluídos nesta revisão de bibliografia 46 artigos publicados no período entre os anos de 2012 e 2017, na língua inglesa, cujo tipo de pesquisa é aplicada.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 INFECÇÕES VIRAIS

Os vírus infectam as células eucariotas por meio de receptores específicos, e após a endocitose, o genoma viral é transcrito, replicado e traduzido para a criação de novas partículas virais. Para isso, alguns vírus de DNA e genomas de retrovírus são integrados ao genoma celular. A edição genômica é uma forma muito nova de tratamento de infecções virais. Dada a natureza do funcionamento do sistema CRISPR-Cas, tem-se um grande potencial para o tratamento de doenças virais que mantem seu genoma na célula hospedeira, incorporando ou não seu genoma no da célula hospedeira (LIJUAN, SIQI e FEI, 2015).

4.2.1 Hepatite B

O Vírus da Hepatite B (HBV) é um vírus de DNA que se replica por transcrição reversa, sua transmissão ocorre pelas vias parenteral e sexual. Segundo Zampino et al (2015) 240 milhões de pessoas são portadoras do HBV no mundo, sendo que em metade desses casos, se tem o desenvolvimento de doenças hepáticas crônicas. O tratamento desse tipo de infecção é de grande impacto econômico para muitos países, em especial os em desenvolvimento. Com o desenvolvimento da primeira vacina nos anos 80 e programas de vacinação universal que começaram nos anos 90, houve uma grande redução no número de novos casos em diversos países, porém algumas populações sem acesso a esse recurso continuam com uma elevada taxa de infecção.

Quando o tratamento é eficaz, a taxa de cura clínica chega a 95%, contudo, metade dos portadores apresentam sinais de inflamação no fígado, o que, no decorrer dos anos, pode resultar em desenvolvimento de cirrose hepática e/ou hepatocarcinoma. Em cerca de 5% dos casos, a hepatite se cronifica, sendo possível a detecção sorológica do antígeno de superfície Hbs (AgHbs) por mais de seis meses. Na hepatite B crônica, se observa duas fases distintas da doença: na primeira se tem intensa

replicação viral, com atividade inflamatória portal e periportal, e genoma viral em estado episomal. Na segunda fase, a replicação viral e inflamação estão reduzidas e o genoma viral integrado ao do hepatócito, infelizmente a segunda fase geralmente se inicia apenas após o paciente estar com um quadro de hepatopatia crônica avançado (FERREIRA, 2000).

O principal objetivo no tratamento da infecção crônica pelo HBV é o de suprimir a replicação viral antes que ocorra dano irreversível ao fígado. Os primeiros fármacos a serem utilizados foram os intérférons alfa e beta, com atividade antiviral e imunomoduladora, porém tais citocinas tem eficácia limitada e seu uso prolongado pode produzir efeitos adversos como febre, mialgia, cefaléia, alopecia, distúrbios neuropsiquiátricos, leucopenia e trombocitopenia, e sintomas de doenças autoimunes podem ser exacerbados. Outras drogas utilizadas no tratamento da doença são os Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (INTR), que bloqueia a síntese de novas partículas virais. Esse tipo de fármaco se mostrou mais eficaz que os intérférons, porém o índice de recidivas após o fim do tratamento continua relativamente alto. (FERREIRA, 2000).

O tratamento da Hepatite B com INTR, por mais que resulte em uma grande diminuição do DNA viral circulante, não afeta as cópias de DNA-HBV circular (cccDNA) já presentes nos hepatócitos. Esse pool de DNA viral continua a produzir proteínas virais, levando a necessidade de um tratamento longo com INTR's, resultando num risco elevado de desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular. A infecção crônica por HBV é prevalente, por vezes incurável e fatal por conta da persistência do DNA viral episomal cccDNA em hepatócitos infectados. Para uma cura completa da Hepatite B, será necessário o desenvolvimento de tratamentos que eliminem por completo os genomas virais do fígado. (KENNEDY, KORNEPATI e CULLEN, 2015; RAMANAN et al., 2015).

Em 2014, estudos começaram a experimentar com sistemas CRISPR-Cas para a criação de terapias para eliminação de cccRNA. Seeger e Sohn (2014) desenvolveram cinco sgRNAs contra regiões do genoma do vírus da hepatite B codificadoras da antígeno core (HBcAg). Células da linhagem celular HepG2-NTCP (originada de

carcinoma hepatocelular) foram transduzidas com vetores de expressão lentivirais de Cas9 e sgRNAs designados. Análises posteriores demonstraram que todos os cinco sgRNAs promoveram clivagem no HBV DNA, sendo que os sgRNA sg5 e sg6 inibiram a expressão de HBcAg entre 6 e 10 vezes quando comparados a controles de células não transduzidas, sendo que o sg5 também diminuiu em 7 vezes a quantidade de células positivas para HBcAg, indicando que apenas 14% das células transduzidas expressaram genomas virais não alterados.

No mesmo ano, outras regiões do genoma de HBV foram clivadas pela Cas9, também com sucesso. Lin et al (2014), desenvolveram oito sgRNAs guias com diferentes regiões do genoma do vírus da hepatite B como alvo. A fim de avaliar a eficiência de cada sgRNA em suprimir a expressão proteica do HBV, foram co-transfectados vetores de expressão com o genoma viral, sgRNAs e Cas9 em células da linhagem celular de hepatoma humano, Huh7. Os sgRNAs P1, S1, PS2 e PS3 exibiram maior eficácia na supressão, reduzindo a expressão em 70, 40, 30 e 20% respectivamente. Num experimento posterior, para aumentar a eficiência do sistema CRISPR-Cas9, foi utilizado um vetor de expressão duplo contendo o sgRNA e cassete de expressão da Cas9. As células transfectadas com tais vetores tiveram uma redução da expressão intracelular de proteínas de superfície virais em até 96% e redução dos níveis de HBsAg do sobrenadante da cultura em até 64%. Posteriormente, para avaliar a eficácia *in vivo* da técnica, se injetou por injeção hidrodinâmica vetores de expressão do HBV e vetores de expressão duplos de CRISPR/Cas9 em camundongos C57BL/6, quando constatou-se que o HBsAg sérico era significativamente menor, no segundo dia pós-injeção, em animais que receberam o vetor com sgRNAs (LIN et al., 2014).

Ainda em 2014, a depleção de cccDNA foi realizada por Dong e colaboradores. Foi utilizado um vetor de expressão bicistrônico px330 expressando a Cas9 e sgRNA mutado, para o grupo controle, e plasmídeos contendo a Cas9 e sgRNAs (pCas9-1 e pCas9-2), cujas sequências foram comparadas ao genoma humano e de camundongo se utilizando do algoritmo BLAST (ferramenta de bioinformática para analisar e comparar sequências biológicas) para avaliar possíveis regiões que possam sofrer atividade off-target da Cas9. Tais RNA guias tinham várias partes do genoma do HBV

como alvo. Foi feita a co-transfecção desses plasmídeos nas células Huh7, juntamente com plasmídeos contendo DNA HBV dos genótipos A, B e D (pTHBV). A eficiência da transfecção foi similar em ambos os grupos e constatou-se que após 48 horas, a concentração de HBsAg no sobrenadante da cultura diminuiu em todas as células transfectadas com pCas9 se comparadas com as células transfectadas com px330, pCas9-1 e pCas9-2 demonstraram a maior redução de secreção antigênio (60%), a secreção de HbeAG teve redução semelhante. Também constatou-se que os efeitos anti-virais de pCas9-1 e pCas-2 foram dose dependentes, porém a co-transfecção de ambos na mesma célula não alterou quantitativamente a secreção antigênica comparado a transfecção isolada. Posteriormente, um experimento com a linhagem celular HepG2.2.15, que carrega o genoma de HBV, com apenas a transfecção de pCas9-1 e pCas-2 (sem a transfecção de pTHBV) e px330 como controle foi realizado, onde demonstrou-se diminuição da secreção de HBsAg. Para se afirmar que o sistema CRISPR-Cas9 tem atividade sobre o cccDNA, transfectou-se um plasmídeo precursor contendo pré-cccDNA e pré Cre Recombinase para recombinação Cre-Lox (assim transformando pré-cccDNA em cccDNA. Comparados a células expressando px330, as que expressavam pCas9-1 e pCas9-2 tiveram uma redução de 60,6% e 75% respectivamente na quantidade total de cccDNA. Num posterior experimento, se analisou a atividade *in vivo* da técnica. Se injetou o plasmídeo com pré-cccDNA e Cre recombinase, junto ao com px300 OU pCas9 na cauda de camundongos. Mediu-se a concentração sérica de HBsAg e HBeAg 6 dias pós-injeção. O grupo injetado com pCas9-1 e pCas9-2 teve redução significativa nas concentrações antigênicas e cccDNA intra-hepático (cerca de 40% para pCas9-1 e 30% para pCas9-2). (DONG et al., 2015).

Em 2015, os resultados anteriores continuaram sendo confirmados por outros pesquisadores. Ramanan e colaboradores (2015) geraram 24 sgRNAs com o genoma do vírus da hepatite B como alvo, levando em consideração a conservação entre genótipos virais e minimização da homologia com o genoma humano. Foram selecionados sgRNAs que tinham como alvo o core, o gene da polimerase viral, e o gene X ORF. Para avaliar a eficácia desses sgRNAs em relação ao reconhecimento das sequências-alvo, a linhagem HepG2 foi co-transfectada com um plasmídeo de expressão de HBV e constructos de expressão da Cas9 e sgRNAs. Em seguida se

mediu a produção de RNA viral pre-genômico 3.5kb (pgRNA 3.5kb) (que é o template para a transcrição reversa do vírus) e a secreção de antígenos de superfície HBsAg para o meio, que são bons parâmetros para a expressão e replicação viral. O uso de cada um dos 24 sgRNA testados em conjunto com a Cas9 tiveram eficiência variada, com maior ou menor redução do HBsAg e pgRNA 3.5kb, constatou-se porém que a combinação de dois ou mais sgRNA's promove maior redução dos parâmetros medidos. Para testar a eficácia da técnica *in vivo* foi usado um modelo de camundongos para HBV onde os plasmídeos Cas9/sgRNA, com apenas um dos sgRNAs projetados, foram introduzidos no fígado de animais imunodeprimidos por injeção hidrodinâmica. Os animais que receberam os plasmídeos contendo o sgRNA inalterado demonstraram uma supressão progressiva da expressão do HBV se comparados ao grupo controle, que recebeu um plasmídeo de expressão da Cas9 e um sgRNA mutado, demonstrado pela diminuição da secreção de HBsAg e uma viremia 4 vezes menor no quarto dia após a injeção.

Um diferença da eficiência de clivagem pela Cas9 entre sequências-alvo foi demonstrada por Karimova e colaboradores (2015), que para avaliar a possibilidade de aplicações curativas no tratamento da HBV por CRISPR-Cas, desenvolveram sgRNAs com as sequências ORF X e ORF S do genoma do vírus da hepatite B (que codificam os antígenos HBs e HBx, respectivamente) como alvo. Uma vez que a atividade da Cas9 original proporciona risco de clivagem *off-target*, o que limitaria sua aplicação em humanos, os pesquisadores propuseram outra abordagem, utilizando uma versão mutada da Cas9 chamada de Cas9 nickase, que promove quebra de fita simples ao invés de uma quebra de fita dupla na sequência-alvo. Numa técnica de nickase-dupla, onde duas quebras de fita simples são feitas em fitas opostas de DNA, a especificidade é melhorada drasticamente. Plasmídeos contendo a Cas9 nickase e sgRNA's S1 e S2 (com alvo ORF S) e X1 e X2 (com alvo ORF X) foram co-transfectados por transferência lentiviral em duas linhagens de hepatoma humano HepG2-H1.3 (que possuem um genoma viral integrado que tem um códon de parada prematuro no ORF X) e HepG2. As análises moleculares das culturas demonstraram uma taxa de edição das sequências-alvo de 41,1% para o sgRNA S1, 46,5% para S2, 84,8% para X1 e 93,9% para X2.

No mesmo ano, pesquisadores chineses demonstraram que a utilização de mais de um sgRNA ao mesmo tempo pode ser mais eficaz para editar os genomas virais. Foram desenvolvidos oito sgRNAs levando em consideração sequências preservadas entre 26 genótipos de HBV. Os sgRNAs, juntamente com a Cas9 foram codificados num vetor de expressão quimérico, e nomeados como T1 a T8. Constatou-se que os níveis de transcritos de HBV na cultura foram significativamente mais baixos em células transfectadas com T1 a T8 quando comparados com o grupo controle, que recebeu o plasmídeo p-SV-Beta-gal. Quatro dias após a co-transfecção, o DNA intermediário de replicação viral e DNA de offspring virion foram extraídos do sobrenadante da cultura celular e as quantidades determinadas por PCR em tempo real. Constatou-se que todos vetores com sgRNAs e Cas9 (T1-T8) suprimiram drasticamente a replicação viral, e células co-transfectadas com mais de um sgRNA (Tmix) tiveram uma inibição até cem vezes maior do que o grupo controle sobre o HBV DNA intracelular e extracelular. Para avaliar a eficácia dessa técnica *in vivo*, pHBV1.3 junto aos vetores T1, T7 e Tmix foram injetados em camundongos BALB/c por injeção hidrodinâmica. Quatro dias após a injeção, os soros sanguíneos dos animais foram coletados para quantificação do HBV DNA, HBsAg e HBeAg séricos. Comparados ao grupo controle, os parâmetros nas amostras dos camundongos injetados com T1, T7 e Tmix foram detectados em níveis drasticamente menores, enquanto o grupo controle apresentava cerca de 7,5 milhões de cópias/ml, T1, T7 e Tmix apresentaram menos de 1 milhão de cópias/ml. Notou-se também que os transcritos de HBV RNA foram diminuídos em T1 e T7 e quase eliminados em Tmix. (LIU et al., 2015)

Ainda em 2015, um resultado mais robusto na eliminação do material genético de HBV foi realizado por Kennedy e colaboradores (2015), que desenvolveram três sgRNAs contra ORFs do genoma HBV que codificam o antígeno de superfície, core e transcriptase reversa. Vetores de expressão lentivirais contendo tais sgRNAs e Cas9 foram transduzidos em células da linhagem HepAD38, que é capaz de mimitizar a replicação do HBV e produzir níveis robustos de cccDNA e para o controle positivo, utilizou-se vetores com sgRNA não específicos (sem o genoma HBV como alvo). Ambos os RNA guias reduziram quantitativamente o HBV DNA intracelular (de 10 a 125 vezes) e no sobrenadante da cultura (de 100 a 800 vezes). Para testar a capacidade da

técnica em inibir a acumulação de cccDNA, as células HepAD38 foram analisadas quatorze dias após transdução, usando PCR em tempo real. O sgRNA com a transcriptase reversa como alvo suprimiu a formação de cccDNA em 10 vezes e reduziu a acumulação intracelular de HBV DNA em 80 vezes, já os sgRNAs para antígeno de superfície e core, suprimiram em 4 vezes a formação de cccDNA e reduziram o HBV DNA intracelular em 8 vezes. O sgRNA para transcriptase reversa reduziu a formação de cccDNA em 90% e a acumulação de HBV DNA intracelular em 99%. A secreção de HBsAg foi significativamente reduzida em células transduzidas com os vetores com sgRNAs desenvolvidos quando comparados ao grupo controle.

Tal edição robusta também fora realizada com sucesso por Wang e colaboradores (2015) que desenvolveram 15 sgRNAs contra o genoma de HBV, levando em consideração a sequência PAM 5'-NGG da SpCas9 e a diferença de pelo menos 3 nucleotídeos do genoma humano para prevenção de atividade off-target. A fim de avaliar a eficiência desses sgRNAs, células da linhagem Huh7 foram co-transfectadas com vetores de expressão sgRNA/Cas9 e um plasmídeo contendo o genoma de HBV genótipo C (PBB4.5-HBV1.2). Todos os sgRNAs suprimiram significativamente os níveis de HBsAg no sobrenadante da cultura, contudo os RNA guias com as regiões S e I do genoma viral como alvo tiveram uma maior eficiência comparados aos RNA guias contra as regiões X e preC/C. Quase todos os sgRNAs diminuíram os níveis de HBeAg, em especial aos sgRNA contra a região preC/C, porém dois sgRNAs contra a região X não tiveram efeito sobre os níveis de HBeAg. Posteriormente se combinou dois sgRNAs de maneira otimizada, levando em consideração os resultados anteriores, e constatou-se uma eficiência superior a 90% de genomas virais editados na cultura celular.

A redução de antígenos séricos e DNA viral também fora realizada por Zhen e colaboradores (2015), utilizando RNA guias desenvolvidos para identificar ORF S e X do genoma do vírus da hepatite B. Células da linhagem celular HepG2.2.15 foram co-transfectadas com plasmídeos de expressão de sgRNAs e hCas9, e o grupo controle não recebeu nenhum vetor de expressão. 48 horas após a transfecção, constatou-se uma significativa diminuição nos níveis de HBsAg (61% para o sgRNA S1 e 56% para o

sgRNA X3) no sobrenadante da cultura comparados ao grupo controle, analisados por ELISA. Análises posteriores também identificaram grande diminuição do cccDNA (70% menor se comparado ao grupo controle para sgRNA X3). Posteriormente se realizou um estudo *in vivo* em camundongos BALB/c-HBVtg, que são um modelo para Hepatite B, e BALB/c como grupo controle, com a injeção hidrodinâmica dos plasmídeos de expressão sgRNA/hCas. Com o sgRNA S1 se teve uma redução de 85% do HBsAg sérico 1 dia pós-injeção se comparados ao grupo controle. Com a co-transfecção de sgRNA S1 e sgRNA X3, a redução foi de 93% 1 dia pós-injeção. Em posteriores análises com o ensaio T7 endonuclease 1 (T7E1), os animais que tiveram os vetores com RNA guias e Cas9 transfectados tiveram uma taxa de mutação entre 58 a 75% do cccDNA hepático.

4.2.2 Vírus da imunodeficiência humana (HIV)

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um membro da família retroviridae capaz de infectar células do sistema imune como linfócitos T CD4+, macrófagos e células dendríticas. Células T CD4+ são infectadas, e no momento que se tornam células de memória (antes de serem eliminadas pelo sistema imune) se estabelece a infecção latente por HIV. Estima-se que atualmente 35 milhões de pessoas infectadas com o HIV no mundo e dos quais cerca de 15 milhões realizam tratamento antirretroviral para o controle da infecção (CHEN et al., 2013; KUMARASAMY, 2016).

Apesar disto a infecção por HIV e a Síndrome da Imunodeficiência Humana (AIDS) ainda persistem como um problema de saúde global, e se tem pouca esperança de um tratamento curativo num futuro próximo. Visto que o tratamento antirretroviral é capaz de suprimir a replicação viral, porém não consegue eliminar os genomas virais das células infectadas, que ficam como reservatórios para o HIV. Além disso, o tratamento com antirretrovirais pode levar a considerável toxicidade e efeitos adversos para os pacientes, como também gerar resistência a terapia (o que implica na troca das medicações utilizadas), e, quando há interrupção do tratamento, pode levar a um rebote na carga viral. Também é preciso ressaltar que tal terapia deve ser feita por toda a vida do paciente, e a falha da mesma implica no risco de desenvolvimento da AIDS. Novas

terapias com anticorpos monoclonais vêm demonstrando eficácia limitada e surgimento de vírus resistentes que também levam ao rebote viral. Até o presente momento, nenhuma vacina demonstrou eficiência suficiente para aplicação em larga escala (CHEN et al., 2013; SAAYANMAN et al., 2015).

Segundo Saayanman (2015), considerando a manutenção dos reservatórios virais mesmo com a aplicação dos tratamentos, alguns estudos foram realizados com o intuito de realizar a excisão, eliminação ou inativação do material genético viral das células que servem de reservatório utilizando o sistema CRISPR-Cas, como também a alteração do gene *CCR5*, que codifica o receptor de quimiocina 5 (*CCR5*) de leucócitos serve como co-receptor para a infecção pelo HIV-1.

Considerando que indivíduos que possuem mutações em seu gene inibindo sua expressão são protegidos contra tal infecção viral, Kang e colaboradores (2015) criaram um sgRNA (gRNA1) contra a região de fase de leitura aberta do gene *CCR5*, afim de inativá-lo. A linhagem DF19-9-7T de células tronco pluripotentes induzidas derivadas de fibroblastos foi transfectada com um plasmídeo de expressão de Cas e sgRNA, sendo selecionadas 288 colônias nas quais se constatou-se, através da amplificação do gene *CCR5*, que 12,5% das colônias tiveram edição do gene, e dessas, 22,2% tiveram edição bialélica. Posteriormente, afim de avaliar se o uso de 2 sgRNA levaria a uma taxa de edição maior, outros 2 sgRNA foram desenvolvidos (gRNA2 e gRNA3) com homologia à regiões 500 pares de base downstream do locus alvo do gRNA1. A combinação de gRNA1 e gRNA2 resultou em 30,8% de clones mutados, enquanto a combinação de gRNA1 e gRNA3 resultou em 23,3% dos clones mutados, sendo que 40% dos clones mutantes tiveram edição bialélica. Experimentos posteriores demonstram que as células-tronco com o gene *CCR5* mutado mantiveram a capacidade de se diferenciar em progenitores hematopoiéticos e leucócitos imunocompetentes. Posteriormente, clones que tiveram edição bialélica foram infectados com HIV-1 BaL-1 e HIV-1 SF162 com tropismo pelo receptor *CCR5* em grandes quantidades (350-400 pg por cultura) para avaliar a proteção contra o vírus. O grupo controle, que não foi editado através de CRISPR-Cas, teve grandes quantidade de p24 detectadas no sobrenadante

da cultura 3 dias após a infecção, em contraste as células editadas, que não apresentaram quantidades detectáveis de p24 durante o monitoramento.

Em 2016, Kaminski e colaboradores, afim de testar a capacidade de uma sistema CRISPR-Cas9 em eliminar o genoma HIV-1 de células, desenvolveram sgRNA denominados “A” e “B” que tem como alvo sequências LTR U3 do provírus de HIV, e posteriormente transfectaram com plamídeos de expressão de sgRNA e Cas9 em linfócitos T da linhagem 2D10, que possuem cópias integradas de HIV-1 cujo genoma tem o gene da proteína Nef substituído por um gene que codifica uma proteína de fluorescência (GFP), assim servindo como marcador. As células transfectadas com apenas a Cas9, a produção de GFP aconteceu em 90% das mesmas, sendo que as células que receberam os plamídeos com sgRNA tiveram a produção dessa proteína completamente eliminada, sendo a transfecção dos sgRNA A e B isoladamente ou co-transfectados a eficiência foi idêntica. Testes posteriores confirmaram a excisão de 100% das sequências-alvo nas células tratadas, que levou a hipótese de que a expressão contínua da Cas9 impede a transposição ou re-integração das sequências clivadas. A atividade *off-target* foi quase nula, sendo detectadas poucas alterações, numa distância de 60 pb adjacentes a sequência-alvo. Posteriormente, foi realizado um experimento com células T CD4+ de indivíduos saudáveis. Tais linfócitos foram infectados com HIV-1 e transduzidos com um vetor de expressão lentiviral de sgRNA e Cas9. Os resultados demonstraram uma clivagem eficiente dos genomas virais das células que receberam os sgRNAs se comparadas ao grupo que recebeu apenas a Cas9, constatou-se também um número significativamente menor de cópias virais na cultura que recebeu sgRNAs em relação ao grupo controle. Em seguida, leucócitos agranulócitos e linfócitos T CD4+ de 4 pacientes (Casos 1-4) soropositivos para HIV-1, que respondiam de maneira diferente ao tratamento antirretroviral tradicional foram coletados e transduzidos com vetores de expressão lentivirais Cas9-sgRNA e Cas9. Os leucócitos agranulócitos transduzidos com os sgRNAs, demonstraram uma redução da carga viral em cerca de 86% se comparados ao grupo controle, já as células T CD4+ que receberam o lentivirus Cas9-sgRNA tiveram uma redução no número de cópias virais de 92% no Caso 1 e 52% no Caso 2 comparadas ao grupo controle. Análises da produção da proteína p24 demonstraram uma diminuição na replicação viral de 71% no

Caso 1 e 62% no Caso 2, 39% no Caso 3 e 54% no Caso 4 quando as células eram transduzidas com os sgRNAs.

No ano anterior, este mesmo grupo já havia realizado um estudo prova de conceito de excisão de genoma HIV *in vivo*, Kaminski e colaboradores (2015) utilizaram camundongos Tg26 (que carregam um transgene derivado do genoma de HIV-1, mimetizando aspectos clínicos da infecção por HIV) cruzados com camundongos C57BL/6L para estabelecer um modelo animal para HIV tratável com sistema CRISPR-Cas. Foram desenvolvidos dois sgRNAs, sgRNA LTR 1 e sgRNA Gag D, que incorporados a um vetor de expressão de vírus adeno-associado, juntamente com a Cas9 de *Staphylococcus aureus* (saCas9). Primeiramente, afim de demonstrar a eficiência do vetor contendo os sgRNAs e Cas9 em clivar as sequências-alvo, fora realizado um estudo *ex vivo* com fibroblastos embrionários advindos dos camundongos Tg26, sendo que os resultados confirmaram a clivagem das células tratadas em relação a células controle. Para o estudo *in vivo* foram selecionados dois camundongos Tg26 e dois camundongos controle com a mesma idade, sendo que os animais receberam o vetor saCas9/sgRNA por injeção hidrodinâmica duas vezes num intervalo de 5 dias. Após 5 dias da última injeção, os animais foram eutanasiados e amostras de diversos tecidos coletadas. Análises moleculares demonstraram uma eficiente excisão das sequências-alvo em todos os tecidos dos animais que receberam os vetores de expressão, em relação ao grupo controle. Posteriormente, um procedimento semelhante, porém com administração dos vetores por injeção retro-orbital, 2 vezes num intervalo de 5 dias foi realizado com 2 ratos. Comparados ao grupo controle, ratos que receberam os vetores, tiveram reduções nas expressões dos genes virais Gag e Env, de, em média, 78% e 91%, respectivamente.

Em 2016, Wang e colaboradores descreveram que o HIV era capaz de realizar escape viral quando certas sequências eram alvos dos sgRNAs. O grupo desenvolveu 19 sgRNAs contra diversas regiões do genoma de HIV-1. Primeiramente, afim de testar a atividade antiviral da técnica, células 293T, que são empregadas comumente em estudos de retrovírus, foram transfectadas com plasmídeos expressando HIV-1, Cas9 e um dos sgRNA projetados, ou sgRNA com sequências-alvo não virais (luciferase e

GFP), usados como controle para garantir a especificidade. Para quantificar a expressão de HIV-1, a produção de proteína de capsídeo viral p24 foi medida 2 dias após a transfecção, comparadas às células controle, todas as células que receberam os sgRNA tiveram uma produção proteica menor. Em seguida, linfóblastos T da linha celular SupT1 foram transduzidas com vetores de expressão lentivirais expressando a Cas9, sgRNAs e HIV-1 LAI. No grupo controle, composto por células que não foram transduzidas com sgRNA, os níveis da proteína p24 no sobrenadante das culturas aumentou rapidamente, e sendo que sincícios e morte celular foram observados 10 dias após a transdução do vetor de HIV-1 LAI. Enquanto que as células que receberam sgRNAs contra sequência pouco conservadas do genoma viral demonstraram morte celular e sincícios um pouco depois, entre 12-14 dias após transdução, mas significativamente mais cedo que células que receberam RNA guias contra sequências mais conservadas, as quais apresentaram estes parâmetros entre 20 e 43 dias. O tempo até a replicação por escape viral não foi correlacionado com a potência de inibição da produção viral dos RNA guias estabelecida em células 293T. Possivelmente, como a clivagem da Cas9 é seguida de reparo por recombinação não-homóloga, o genoma viral sofre mutações nas regiões clivadas que permitem a replicação viral e conferem imunidade para HIV ao sistema CRISPR-Cas, principalmente com o uso de sgRNAs contra sequências pouco conservadas (WANG et al., 2016a).

Esse mesmo mecanismo de escape viral também foi descrito por Wang e colaboradores, que geraram uma linhagem celular de linfócitos T CD4+ SupT1 que foi posteriormente transduzida com vetores de expressão lentivirais para Cas9 e sgRNA contra o genoma de HIV-1 (T4 e T10) e um grupo controle recebeu vetores que expressam Cas9 apenas. Contatou-se que a replicação viral, mensurada através da atividade da transcriptase reversa no sobrenadantes das culturas, foi retardada em células que receberam T4 ou T10 em relação ao grupo controle, contudo, 14 dias após a transdução, a replicação viral aumentou em células tratadas com os sgRNAs, implicando no escape viral do HIV-1 da supressão por CRISPR-Cas. As mutações decorrentes da edição pela Cas9 foram identificadas e posteriormente transferidas ao DNA HIV-1 parental, sendo que novas células SupT1 foram infectadas com tais vírus mutados e em seguida transduzidas como no primeiro ensaio. Contatou-se que ambos

os grupos tiveram proliferação celular semelhante, confirmando que as mutações induzidas pela clivagem da Cas9 no primeiro teste conferiram imunidade ao HIV-1 contra o sistema CRISPR-Cas usado. Estudos posteriores testaram a eficiência de mais 5 RNA guias contra regiões distintas do genoma viral, sendo que em todos os casos houve o escape viral, mas com diferentes intervalos. Tais resultados sugerem uma necessidade de identificação de novas sequências do genoma de HIV-1 que possam ser alvo do sistema CRISPR-Cas, em especial sequências conservadas e que inviabilizem a produção de partículas virais competentes. (WANG et al., 2016c).

A edição de quase todas sequências-alvo do genoma de HIV de uma dupla de sgRNA *in vitro* fora realizada por cientistas chineses. Os pesquisadores desenvolveram 10 sgRNA que tem a sequência LTR do genoma de HIV-1 como alvo (gLTR1, gLTR7 e gLTR9) ou sequências codificadoras de proteínas virais (gGag1, gGag3, gGag4, gGagPol, gPol3, gTatRev e gEnv2). Afim de testar a eficiência dos sgRNAs em clivar o DNA HIV-1, células 293T foram transfectadas com plamídeos de expressão para HIV-1 LAI, Cas9 e um ou dois sgRNA desenvolvidos ou RNA guias não específicos para o genoma viral como controle. Dois dias após a transfecção, as células que receberam todos os plamídeos contendo um ou dois sgRNAs apresentaram dos níveis da proteína p24 significativamente menores se comparadas as células controle. Posteriormente, células SupT1 foram infectadas com HIV-1 LAI e receberam vetores de expressão lentivirais para Cas9 e sgRNAs, sendo que a replicação viral foi monitorada nas culturas celulares por 60 dias. No grupo controle, composto por células SupT1 que não receberam os vetores, ou vetores expressão apenas a Cas9, a replicação viral acentuada foi constatada pelo rápido aumento dos níveis de p24, sendo que síncios e morte celular aconteceram em tais culturas no dia 8 pós transfecção. A replicação viral foi significativamente reduzida entre 18 e 51 dias pós transfecção para células expressando apenas um sgRNA com sequências codificantes de proteínas virais como alvo, porém após esse período a replicação viral voltou a aumentar. Para as células que receberam um RNA guia contra a sequência LTR a replicação viral ficou reduzida até o 16º dia (gLTR7 e gLTR9), contudo GLT1 teve o aumento da replicação no 8º dia, indicando eficiência insignificante. Tal resultado indica que quando as sequências-alvo do HIV-1 são menos conservadas, o escape viral acontece mais cedo do que em

relação a sequências mais conservadas. A alta mutagenicidade de sequências pouco conservadas do genoma de HIV-1 acabam por inviabilizar o uso de RNA guias contra as mesmas. Em células expressando dois sgRNAs, a replicação viral foi suprimida por mais tempo em quase todas as culturas, com excessão de combinações de gLTR1, gLTR7 e gLTR9, sendo que o tempo até o escape viral foi de 75 a 128 dias. Todavia, células que receberam os vetores de expressão gGag1 + gTatRev e quase todas que receberam vetores de expressão gGag1 + gEnv2 não demonstraram escape viral, mantendo a inibição da replicação viral por todo o tempo de monitoramento. Em análises posteriores, constatou-se que em culturas gGag1 + gTatRev, a taxa de mutação das sequências-alvo para gGag1 foi de 95% e para gTatRev 100%. Em culturas gGag1 + gEnv2, a taxa de mutação foi de 97% em sequências-alvo de gGag1 e 100% de gEnv2. A grande maioria de indels aconteceram no sítio de clivagem da Cas9, com padrão típico de reparo por recombinação não-homóloga mediado pelos sistemas CRISPR-Cas. (WANG et al., 2016b)

Em 2017, a eliminação de genomas virais de células *in vivo* começara a ser realidade de forma mais robusta. Yin et al utilizaram vetores virais adeno-associados para transduzir camundongos NCre, linhagem de animais sem tímo, e com linfocitopenia, com saCa9 e combinações de 4 sgRNAs contra regiões da LTR e gene Gag de HIV via injeção retro-orbital após inoculação de EcoHIV-eLuc (HIV quimérico capaz de infectar camundongos, e que expressa luciferase, enzimas que produz bioluminiscência) pela mesma via de injeção, um grupo controle fora inoculado apenas com EcoHIV-eLuc. Dezenove dias após a inoculação os animais foram eutanasiados, comparados ao grupo controle, animais que receberam os sgRNAs e saCa9 demonstraram uma significativa diminuição da bioluminiscência advinda da atividade da luciferase em linfonodos e apresentaram uma taxa de excisão de até 96% no tecido hepático, em acordo com a taxa de excisão em culturas de células derivadas de camundongos Tg26 do mesmo estudo. Para demonstrar a viabilidade da excisão do provírus em um modelo animal mais relevante clinicamente, camundongos BLT humanizados, que são cotransplantados com fígado, tímo e células-tronco hematopoiéticas humanas, foram inoculados com HIV M-trópico-eLuc por transmissão na mucosa vaginal ou injeção intraperitonal e em seguida, pelas mesmas vias, foram

transduzidos com vetores adeno-associados com saCa9 e combinações dos sgRNAs supracitados. Os animais demonstraram sinais de disseminação viral local ou sistêmica, contudo, a partir de 60 dias após a inoculação, a infecção começou a diminuir e em 70 ou mais dias, os animais não demonstravam sinais de infecção, constatada pela ausência da atividade da luciferase (YIN et al., 2017).

4.2.3 Vírus do papiloma humano (HPV)

O vírus do papiloma humano (HPV) pertence a família papillomaviridae, sendo um vírus de DNA que causa a infecção sexualmente transmitida mais comum mundialmente. Majoritariamente, indivíduos infectados são assintomáticos e eliminam a infecção num período de dois anos. Contudo, a persistência da infecção por cepas de alto risco são um importante fator na predição do desenvolvimento de câncer cervical e outras neoplasias, como cânceres de vulva, vagina, pênis, anus e boca e faringe. Atualmente, foram identificados mais de 200 genótipos do vírus. O aparecimento de condilomas (verrugas genitais) é o sintoma mais comum da infecção, principalmente em homens, sendo causados principalmente pelos subtipos HPV-6 e HPV-1, que representam 90% dos casos. Mesmo com remoção cirúrgica ou tratamento farmacológico, o reaparecimento das verrugas é muito comum, o que resulta em alto custo financeiro com gastos médicos ao paciente. (SILVA et al., 2017)

De acordo com Yim e Park (2005), em seu genoma, o HPV possui os genes E6 e E7, que codificam oncoproteínas, que possuem funções pleiotrópicas, como sinalização transmembrana, regulação do ciclo celular, transformação de células linhagem celulares estabelecidas, immortalização celular e regulação da estabilidade cromossômica. Sabe-se que a expressão desses genes são necessários para a conversão maligna da neoplasias surgidas em decorrência da infecção viral.

O câncer cervical, que é o terceiro tipo de câncer mais comum em mulheres, tem como a principal causa a infecção por HPV. Estudos chegam a sugerir a presença do vírus em 100% dos casos, em especial infecções por HPV-16 e HPV-18 (70% dos

casos). Todo ano, cerca de meio milhão de mulheres são diagnosticados com tal neoplasia, sendo que aproximadamente 250.000 pacientes acabam por falecer anualmente. Exames citopatológicos continuam sendo a principal forma de detecção de anormalidades no colo uterino e prevenção do câncer cervical. (CHATZISTAMATIOU et al., 2017)

Segundo Audisio et al (2016), com o advento da vacina quadrivalente contra o HPV (eficaz para HPV-18, HPV-16, HPV-11 e HPV-6), o número de infecções caiu consideravelmente na última década, sendo que seu uso terapêutico em casos de cânceres e condilomas demonstraram significativa melhora, contudo a cobertura por programas vacinais ainda é bastante precária na maior parte dos países. De qualquer maneira, a infecção persistente por HPV e suas complicações continua sem uma terapia curativa, pois cópias virais permanecem latentes em células de indivíduos infectados.

Afim de inativar os genes virais E6 e E7 em células infectadas por HPV-18, Kennedy et al., em 2014, desenvolveram sgRNAs contra sequências-alvo desses genes. Células da linhagem celular HeLA (originada de tumor maligno cervical, positivas para HPV-18) foram transfectadas com um vetor de expressão px330 para Cas9 e RNA guias projetados. (E6sgRNA1 ou E7sgRNA1), e 2 dias após a transfecção, constatou-se que 22,6% das genomas virais sofreram indels no locus do gene E6 e 22,8% no locus do gene E7. Em experimentos posteriores, foi demonstrado um significativo aumento da expressão das proteínas p53 (que atua na regulação do ciclo celular, sendo supressora de tumores) e p21 (que regula a transição da fase G1 para fase S do ciclo celular) em células que receberam E6sgRNA1, mas não em células controle ou que receberam E7sgRNA1. A expressão do gene E6 sabidamente interfere na expressão desses genes do hospedeiro. Células que receberam E7sgRNA1 tiveram um moderado aumento na expressão da proteína Rb. A expressão de E7 está relacionada à inativação da proteína Rb, se ligando à sua forma hipofosforilada, induzindo sua degradação e prevenindo a formação de complexos Rb/E2F que bloqueiam a continuação do ciclo celular. Em análises posteriores, foi observado que, comparadas às células controles, culturas que receberam os RNA guias e Cas9 tinham

uma maior porcentagem de células com o ciclo celular interrompido, senescentes ou que entraram em apoptose, indicando uma diminuição da malignidade da cultura.

No mesmo ano, Hu e colaboradores também editaram o gene viral E7, porém em células de câncer cervical positivas para HPV-16 (linhagens celulares SiHa e Caski). Foram desenvolvidos sgRNA com sequências do locus de tal gene como alvo. Plasmídeos de expressão de Cas9 e sgRNAs foram transfectados em células das linhagens celulares SiHa e Caski (originadas de carcinoma escamoso cervical) positivas para HPV-16, C33A (originada de carcinoma cervical) e HEK293 (originada de células renais embrionárias) negativas para HPV, como grupo controle. Células SiHa que receberam os RNA guias tiveram uma taxa de apoptose entre 40-56%, dependendo do sgRNA transfectado, já a taxa em células Caski ficou entre 35-48%. Células do grupo controle tiveram uma taxa de apoptose menor que 10%. Em seguida, o RNA guia mais eficiente foi transfectado junto a Cas9 em células SiHa e Caski afim de avaliar a inibição da proliferação celular pelo uso da técnica. Após 72 e 96 horas após a transfecção, se comparado ao grupo controle, houve uma redução significativa na viabilidade celular das células tratadas com o RNA guia. Posteriores análises demonstraram uma redução da expressão do gene viral E7 e aumento da proteína supressora de tumor Rb em células SiHa e Caski que receberam os plasmídeos de expressão contendo a Cas9 e sgRNA desenvolvido. (HU et al., 2014)

Também em 2014, obtendo uma taxa de apoptose similar ao estudo anterior, Yu e colegas desenvolveram RNA guias contra regiões do gene E6 do genoma de HPV-16. Plasmídeos de expressão de Cas9 e RNA guias foram transfectados em células das linhagem celulares SiHa e Caski. Análises moleculares demonstraram uma taxa de mutação nos loci alvo dos sgRNAs que variou entre 17% a 22%. Afim de demonstrar se as mutações geradas no gene viral E6 levavam a apoptose, células SiHa e Caski (positivas para HPV-16) e C33A e HEK293 (negativas para HPV-16) foram transfectadas com os RNA guias mais eficientes e Cas9. As células não infectadas pelo vírus demonstraram uma taxa de apoptose menor que 10% no uso ambos os sgRNAs, já as células positivas para HPV-16 tiveram uma taxa de apoptose que variou entre cerca de 35% a 45%. Os resultados confirmam que sistemas CRISPR-Cas pode

ser uma ferramenta no tratamento de neoplasias provocadas por infecções pelo vírus do papiloma humano. (YU et al., 2014)

Por fim, Zhen e colegas conseguiram realizaram uma taxa de clivagem altíssima de genes virais e demonstraram a atividade antitumoral do sistema CRISPR-Cas aplicado para esse fim. Foram desenvolvidos sgRNAs contra os genes virais E6 e E7 de HPV-16. Juntamente com a Cas9, tais sgRNAs foram transfectados em células SiHa por meio de plasmídeos de expressão, reduzindo a expressão dos genes E6 e E7 em até 94%. As células tratadas com a Cas9 e sgRNAs, 2 dias após a transfecção tiveram um aumento significativo nos níveis das proteínas supressoras de tumor p53 e p21, o que levou a supressão do crescimento celular. Em posterior experimento, células SiHa transfectadas ou não com os plasmídeos de expressão Cas/sgRNA foram inoculadas subcutaneamente em camundongos BALB/C nude. Em até 10 semanas após a inoculação apresentaram formação de tumores. Os camundongos que receberam células transfectadas com sgRNAs e Cas9 tiveram um crescimento tumoral mais lento, e foi observado que animais tratados com o sistema CRISPR-Cas apresentaram uma redução no peso dos tumores. (ZHEN et al., 2014)

4.2.4 Vírus da herpes simples (HSV)

De acordo com Okonko et al (2014), o vírus da herpes simples (HSV) é um vírus de DNA pertencente à família herpesviridae, sendo um importante patógeno de humano, causando lesões faciais e genitais bem características dessa infecção viral. Existem dois tipos de HSV, o HSV-1 que é associado principalmente com infecções orofaciais, e HSV-2, que geralmente infecta a genitália, sendo considerado o principal agente infeccioso transmitido sexualmente.

Segundo Geltz, Gershburg e Halford (2015), estima-se que mais de meio bilhão de pessoas estejam infectadas pelo HSV-2, sendo que desses, 20 milhões apresentam reaparecimento de lesões genitais mais de uma vez ao ano, e que 67% da população mundial com menos de 50 anos de idade esteja infectada por HSV-1. Indivíduos

infectados por HSV-2 têm um risco 3 vezes maior de adquirir uma infecção por HIV, devido as lesões provocadas por um episódio de herpes genital (facilitando a entrada do HIV) e consequente concentração de macrófagos na região, células que são infectadas pelo vírus.

A infecção genital em gestantes é de grande preocupação uma vez que a transmissão vertical para o feto ou recém-nascido está relacionada ao parto prematuro, retardo do crescimento fetal, aborto espontâneo, danos neurológicos, e mortalidade perinatal de até 50% em infecções neonatais. Isso ressalta a importância da detecção da infecção por HSV em mulheres grávidas ou que pretendem ter filhos (OKONKO et al., 2014).

Após a infecção primária nas mucosas, o HSV estabelece uma infecção latente em neurônios sensoriais dos gânglios trigeminais ou dorsais, sendo que a replicação viral pode ser reativada posteriormente, causando lesões recorrentes. Tratamento com antivirais como o acyclovir podem diminuir a severidade das lesões ou frequência de episódios, mas não eliminam a infecção. Até o presente momento, não há nenhuma vacina em utilização contra o vírus ou cura para a infecção (AUBERT et al, 2014).

Em 2014, as primeiras tentativas de se editar os genomas virais de HSV em células humanas foram feitas. Suenaga e colaboradores desenvolveram sgRNAs contra o gene gE de HSV-1 que foram clonados em plasmídeos de expressão da Cas9. Linfócitos T da linhagem celular HEK293 foram transfectados com tais plasmídeos e também infectados com HSV-1 além de plasmídeos expressando a proteína CD8 humana como um marcador da transfecção. Análises moleculares demonstraram que cerca de 60% das células sofreram edição por atividade da Cas9. Em experimentos seguintes, sgRNAs contra o gene TK, que é responsável pela susceptibilidade do HSV ao tratamento por acyclovir, já que a tal fármaco é fosforilado pela proteína TK viral, e sua forma fosforilada inibe competitivamente a DNA polimerase viral, inibindo a replicação do vírus. As células HEK293 foram então transfectadas com os novos sgRNAs, e se constatou uma edição de cerca de 50% dos genomas virais. A inserção do fármaco nas culturas apresentou-se como um fator de seleção, visto que todos os clones continham mutações no gene TK.

No ano seguinte, o uso de sgRNAs contra um outro gene de HSV foi explorado por Tumer et al., que buscaram entender a importância da proteína transmembrana do retículo endoplasmático LULL1 na replicação viral de HSV-1. Essa proteína está envolvida na regulação da ATPase torsina A, que por sua vez é importante nas dinâmicas da membrana nuclear e egresso nuclear do HSV-1. Para isso, o grupo de pesquisadores buscou gerar uma linhagem celular com o nocaute do gene *LULL1* utilizando o sistema CRISPR-Cas. Células HeLa foram transfectadas com plasmídeos expressando sgRNAs contra o gene *LULL1* e Cas9. Os clones que inativaram o gene, foram selecionados e infectados com HSV-1. Posteriores análises demonstram que as células editadas tinham 10 vezes menos genomas virais, que as células do grupo controle, que não foram transfectadas, contudo, a produção de proteínas virais foi semelhante em ambos os grupos. Demonstrando que o gene *LULL1* não está envolvido na entrada viral, transcrição de genes virais ou produção de proteínas virais, mas sim na replicação e/ou manutenção do genoma viral (TUMER et al., 2015).

Já em 2016, Diemen e colaboradores conseguiram eliminar genomas virais ativos com sucesso, contudo a Cas9 não foi efetiva contra genomas virais quiescentes em células humanas *in vitro*. Se desenvolveu RNA guias contra 12 genes de HSV-1. Células da linhagem celular Vero (originada de células epiteliais renais do primata *Chlorocebus aethiops*) foram transduzidas com vetores de expressão de Cas9 e sgRNAs e posteriormente infectadas com HSV-1-eGFP (que expressa a proteína de fluorescência verde, GFP). Dois dias após a transdução, constatou-se que as células do grupo controle tiveram uma taxa de expressão de GFP entre 70% a 90%, já células transduzidas com os sgRNAs contra genes virais e Cas9 tiveram uma taxa inferior a 10% para a maioria dos sgRNAs. Contudo, no terceiro dia após a infecção, as células que receberam a maioria dos sgRNAs tiveram um grande aumento da expressão de GFP, indicando a criação de mutantes de escape que são imunes à edição por CRISPR-Cas, entretanto o RNA guias contra os genes virais UL29, UL8 e UL52 mantiveram sua eficácia. Posteriormente, combinações de 2 dos 3 sgRNAs mais eficientes foram transduzidos juntos a Cas9 em células Vero, onde se observou uma redução de células expressão GFP durante os 3 dias após a transdução. Os sobrenadantes das culturas foram submetidos a quantificação viral em seguida, sendo

que observou-se a redução de em até quatro vezes da titulação de partículas virais em células que receberam apenas um RNA guia comparadas ao grupo controle, contudo, células que receberam a combinação de dois RNA guias contra UL29, UL8 e UL52, resultou na perda total de partículas virais. Em seguida, afim de avaliar a eficiência da técnica em editar genomas virais no estado quiescente, células da linhagem celular MRC5 (origidas de fibroblastos pulmonares humanos) foram infectadas com HSV-1-eGFP e imediatamente incubadas a 42°C por 4 dias afim de mimitizar uma infecção latente por HSV-1. As células foram então transduzidas com vetores expressando Cas9 e RNA guias, e posteriormente o HSV1-eGFP foi reativado com a infecção das células pelo citomegalovírus humano e a replicação viral monitorada. Análises posteriores indicaram uma edição de 1% a 6% dos genomas virais das células MRC5, indicando que o sistema CRISPR-Cas usado foi eficiente na edição de genomas virais ativos, mas ineficiente na edição de genomas virais quiescentes. (DIEMEN et al., 2016)

4.3 DOENÇAS GENÉTICAS

Uma doença genética é causada por uma anormalidade no código genético de alguma pessoa. Essas alterações podem incluir desde a troca de um único nucleotídeo em apenas um gene, ou envolver a adição e remoção de parte de um cromossomo ou até cromossomo inteiro. Como consequência, a síntese dos produtos acaba sendo alterada, sendo aumentada ou se tornando ausente, levando a modificações nas rotas metabólicas e funções fisiológicas do indivíduo portador dessa anormalidade (KULIEV; VERLINSKY, 2005).

4.3.1 Anemia falciforme

A anemia falciforme é uma das doenças hereditárias monogênicas mais comuns no mundo, que afeta principalmente afrodescendentes. Tal condição é causada por uma mutação no gene HBB que codifica a beta-globina, componente da hemoglobina,

resultando na troca do ácido glutâmico por valina na posição 6 do gene. A doença tem padrão de herança autossômica recessiva, que resulta na formação da hemoglobina S (com duas beta-globinas mutadas e duas alfa-globinas) no lugar da hemoglobina A (duas beta-globinas normais e duas alfa-globinas), que representa cerca de 90% de toda hemoglobina de um indivíduo saudável. A hemoglobina S, em condições como baixa oxigenação, acidose metabólica ou desidratação, forma polímeros e muda irreversivelmente a estrutura da hemácia, fazendo com que a célula mude estruturalmente, num processo chamado de falcemização, o que impede seu funcionamento adequado e leva à oxigenação ineficiente, além de reação inflamatória endotelial (ALLISON, 2009; RODRIGUES et al., 2016).

O diagnóstico laboratorial é feito com eletroforese de hemoglobinas e cromatografia líquida. Os sintomas da doença variam muito em severidade. Dano progressivo de órgãos pode ocorrer em qualquer parte do corpo como resultado de bloqueios vasculares e oxigenação local ineficiente, sendo que a complicação mais comum é a crise vaso-oclusiva, que se caracteriza como uma dor recorrente provocada por dano tecidual e inflamação causada pela falcemização. A anemia também causa fadiga, falta de ar e tontura e o dano no baço pela aumentada destruição de células e obstrução de vasos, além do comprometimento imunológico pela constante inflamação por dano tecidual faz com que indivíduos afetados tenham maior risco de contrair infecções. A crise vaso-oclusiva em vasos pulmonares pode provocar complicações análogas a uma pneumonia potencialmente fatal. Atualmente o tratamento se dá com a prevenção de complicações e com o fármaco hidroxiureia, que aumenta a quantidade de hemoglobina F afim de compensar a ausência de hemoglobina A. Em casos mais sérios pode ser realizado transplante de células-tronco, contudo possui várias complicações (NGO e STEINBERG, 2014).

Considerando que a clivagem promovida pela Cas9 pode ser reparada por vias de reparo por homologia utilizando um template doador, com a sequência a ser inserida na sequência clivada pela Cas9, Huang et al., em 2015, utilizando sgRNAs contra sequências no gene HBB que incluem a mutação causadora da anemia falciforme e íntron 1, transfectaram células-tronco pluripotentes induzidas da linhagem celular TNC,

homozigotas para a mutação, com a Cas9, um plamídeo doador com as sequências a edição do gene HBB no local da mutação, e introdução de uma gene de resistência à puromicina, assim facilitando a seleção das células editadas. Entre as colônias resistentes à puromicina, 50% eram positivas por pelo menos uma das inserções. Em um dos clones analisados (SC15), um alelo teve a correção da mutação e o outro recebeu uma inserção de um nucleotídeo que codificava um códon de parada, impossibilitando sua transcrição. Neste caso a inserção foi benéfica, pois somente o alelo corrigido é capaz de produzir uma beta-globina. Como a expressão do gene de resistência à puromicina pode interferir na expressão do gene HBB, Clones SC15 foram transfectados com um plamídeo expressando a proteína Cre, o que levou a excisão do gene. Posteriormente as células TNC1 SC15 e SC15-Cre2 (que tiveram excisão pela Cre) foram induzidas a diferenciação em eritrócitos, onde se observou um nível de produção de beta-globinas similar ao das células parentais TNC1 não editadas para células SC15-Cre2 e baixo para células SC15, como esperado.

No ano seguinte, células corrigidas com sucesso foram transplantadas em camundongos. Para isso, ocorreu o desenvolvimento de sgRNAs contra o polimorfismo do gene HBB causador da Anemia Falciforme levando em consideração a distância do sítio de reconhecimento do sgRNA e a mutação, além da habilidade em clivar o PAM, assim impedindo uma nova edição pela Cas9 ao alelo já corrigido. Afim de selecionar os sgRNAs guias e templates de reparo (oligodesoxinucleotídeos de fita simples, ssODNs) mais eficientes, células da linha celular K562 (semelhante a progenitoras hematopoiéticas, originadas de leucemia eritroide aguda) receberam combinações de sgRNAs, templates de reparo e Cas9 por eletroporação. Primeiramente, foi testado um ssODN denominado T1, que continha mutações silenciosas em todos nos PAMs de todos os sgRNAs criados e uma mutação idêntica ao polimorfismo causador da anemia falciforme e um ssODN denominado T2 semelhante a T1, porém apenas com mutações nos PAMs de dois sgRNA. Análises moleculares demonstraram que a taxa de clivagem pela Cas9 ficou entre 35% a 40%, incluindo todos os sgRNAs testados, já a taxa de reparo por homologia variou de 11% a 41% dependendo o sgRNA. A atividade off-target foi muito pequena, porém o uso de certos sgRNA promoveram edições em regiões exônicas com certa homologia à sequência-alvo dos genes FSCN3 e GTDC2. O

sgRNA guia mais eficaz, juntamente com templates de reparo semelhantes a T1 e T2, porém com a correção da mutação em questão do gene HBB e Cas9 foram inseridos em células-tronco hematopoéticas CD34+ de um indivíduo com anemia falciforme. Análises demonstraram que entre 18% e 25% dos alelos HBB dessas células foram corrigidos a sua forma selvagem, contudo a taxa de clivagem da Cas9 foi superior a 80%. Posteriormente, foi induzidas a diferenciação destas células em eritrócitos nucleados e eritroblastos e avaliada a produção de hemoglobina por cromatografia líquida. Constatou-se que nas células editadas produziram entre 22,2% a 29,3% de hemoglobina A (HbA) e 38,7% a 50,6% de hemoglobina S (HbS), os níveis de hemoglobina fetal (HbF) e hemoglobina A2 (HbA2) também aumentaram em tais células (13% de HbF), células controle que não receberam os RNA guias e templates de reparo produziram cerca de 90% de HbS, 9% de HbA2 e 1% de HbF. Afim de demonstrar a possibilidade do transplante dessas células-tronco editadas, o modelo animal de camundongos imunodeficientes NSG foram transplantados com tais células e após monitoramento de 16 semanas e eutanásia dos ratos para coleta da medula óssea, constatou-se que o número de células editadas era menor do que as transplantadas, mas foram capazes de se proliferar in vivo. (DEWITT et al., 2016).

4.3.2 Retinite pigmentosa

Segundo Zheng et al (2015), a retinite pigmentosa (RP) é um grupo de doenças genéticas que causam degeneração da retina com grande variação fenotípica, sendo caracterizado pela perda de visão noturna, inicialmente, passando a constrição de campos visuais até a cegueira progressiva. Diferente de outras causas de perda de visão, que afetam principalmente a terceira idade, a retinite pigmentosa afeta crianças e adolescentes.

Cerca de 1 em 4 mil pessoas no mundo possuem alguma forma de RP, sua heterogenicidade é tamanha, que mesmo membros de uma mesma família afetados por retinite pigmentosa podem apresentar quadros clínicos distintos. Isso se deve ao fato

de que existem muitos alelos em diversos genes que causam alguma forma de RP. Sabe-se que atualmente que 24 genes estão envolvidos na RP autossômica dominante, 45 genes causam RP autossômica recessiva e 3 genes causam RP ligada ao cromossomo X (SULLIVAN et al., 2014).

Atualmente, terapias mais convencionais incluem suplementação de vitaminas, implantes intra-oculares secretores de fatores neurotróficos (moléculas peptídicas que estimulam o crescimento e diferenciação neuronal) ou próteses de retina eletrônicas. Contudo, tais tratamentos tem pouca eficácia em atenuar o desenvolvimento da doença ou recuperar a visão (ZHENG et al., 2015).

A possibilidade de corrigir uma mutação no gene *RPGR* (envolvido na formação de cílios celulares) causadora de uma forma de retinite pigmentosa ligada ao cromossomo X foi explorada por Bassuk e colegas em 2016. Fibroblastos de irmãos diagnosticados com as doenças foram cultivados e transformados em células-tronco pluripotentes induzidas e diferenciadas com sucesso em células da retina. Estas células foram transfectadas com um vetor de expressão de Cas9 e sgRNAs. O sgRNA mais eficiente (g28) promoveu uma taxa de clivagem de 23%. Posteriormente, as células foram transfectadas com o vetor anteriormente citado em conjunto com um ssODN para reparar o gene *RPGR* (troca do códon de parada prematuro pelo códon “GAG” selvagem), destas cerca de 13% tiveram a correção da mutação. Tal estudo demonstra que um possível caminho no tratamento da retinite pigmentosa por transplante autólogo de células-tronco geneticamente corrigidas.

Varintes do gene *RHO*, codificante da proteína rodopsina que está envolvida na fototransdução de bastões, são a principal causa de RP autossômica dominante. Também em 2016, Badonki e colaboradores desenvolveram um sistema CRISPR-Cas9 para silenciar o alelo mutante RHOS334 presente em ratos S334ter-3. Os animais receberam uma injeção subretinal unilateral contendo plamídeos de expressão de Cas9 e sgRNA seguida de eletroporação para facilitar a transfecção. 4 dias após a injeção as retinas de dois animais foram coletadas e células positivas para mCherry (proteína fluorescente para confirmar transfecção) foram analisadas, e se constatou uma eficiência de clivagem de 33% a 36%, sendo que o alelo selvagem não sofreu ação da

Cas9 em nenhum clone sequenciado. Análises imuno-histoquímicas feitas 33 dias após injeção demonstraram que as retinas tratadas com os vetores de gRNA-TRGT tinham até oito camadas de fotoreceptores em contraste com apenas uma camadas das retinas que receberam um sgRNA controle. As regiões com aumento no número de camadas coincidiam com as regiões positivas para mCherry. Os olhos que receberam gRNA-TRGT tinham uma acuidade 35% maior se comparada ao olho não tratado, enquanto que os olhos que receberam o sgRNA controle tinham uma acuidade 2,3% menor, 39 dias após a injeção (BANKONDI et al., 2016).

Zhu e colaboradores (2017), desenvolveram sg RNA contra sequências dos genes *NRL* e *NR2E3*, que estão envolvidos na regulação do desenvolvimento e diferenciação de bastonetes e cones da retina. Primeiramente, afim de testar a eficiencia de cada sgRNA, fibroblastos de camundongos foram transduzidos com vetores de expressão de vírus adeno-associado (AAV) para Cas9 e outro expressando os sgRNAs. Células que receberam uma combinação de 2 sgRNA contra o mesmo gene tiveram uma maior taxa de clivagem. Posteriormente, vetores AAV para Cas9 e sgRNA foram injetados em camundongos Rd10 e FVB/N, modelos animais para retinite pigmentosa e degeneração de fotoreceptores respectivamente, com 7 dias de vida pela por injeção subretinal. Se constatou que a atividade dos cones de animais editados teve significativa melhora e análises histológicas mostraram que se comparados a camundongos controle, que não receberam os sgRNAs, a camada nuclear externa das retinas de camundongos editados era significativamente mais grossa, implicando numa menor degeneração. Resultados semelhantes foram observados em camundongos FVB/N aos 50 dias de vida. (ZHU et al., 2017)

4.3.3 Distrofia muscular de Duchenne

A distrofia muscular de Duchenne é uma doença genética recessiva ligada ao cromossomo X causada por mutações no gene DMD, codificador da distrofina, proteína que liga o citoesqueleto de fibras musculares à matriz extracelular. A condição afeta 1 a

cada 3500 indivíduos do sexo masculino e causa fraqueza muscular progressiva. Cerca de 60% a 70% das mutações que causam a distrofia são deleções de exons, 5% a 10% são duplicações e o restante são mutações mais sutis, como troca de um único nucleotídeo. As mutações levam a ausência ou deficiência da distrofina, comprometendo a função muscular (TAKESHITA et al 2017).

Mulheres portadoras de mutações no gene DMD geralmente são assintomáticas ou exibem um fenótipo mais brando. Em homens, a doença se desenvolve de maneira severa, com rápida degeneração das fibras musculares. Os sintomas iniciais incluem atraso no desenvolvimento motor e membros inferiores maiores do que o normal entre 1 e 3 anos de idade. Geralmente pacientes perdem a capacidade de andar até os 14 anos de idade, com isso comorbidades como escoliose e contratura muscular se desenvolvem mais rápido. Cardiomiopatia é aparente no final da adolescência, levando posteriormente a dificuldade em respirar e com o tempo a deterioração de músculos cardíacos e respiratórios tornam a condição possivelmente fatal quando o paciente está com cerca de 30 ou mais anos de idade. (RYDER et al., 2017)

A proteína utrofina possui certa homologia com a distrofina, sendo que o aumento da sua expressão foi demonstrado compensar parcialmente a perda de distrofina, indiferentemente da natureza da mutação de pacientes com distrofia muscular de Duchenne. Para investigar o uso desse fato com possível terapia, Wojtal e colegas, em 2017, transfectaram mioblastos de um paciente com distrofia muscular com uma Cas9 inativa (dCas9) ligada a 10 repetições em tandem de um transativador de transcrição VP16 e sgRNAs contra promotores do gene *UTRN* (codificante da utrofina), *UTRN-A* ou *UTRN-B*. Células que receberam sgRNAs contra o promotor *UTRN-A* tiveram um aumento de 1,7 a 2,7 vezes na expressão de utrofina, enquanto células que receberam sgRNAs contra o promotor *UTRN-B* tiveram um aumento de 3,8 a 6,9 vezes em relação a expressão basal. Essa expressão elevada foi acompanhada por um aumento na expressão de distroglicano beta (uma das proteínas que se associam a distrofina ou utrofina formando complexos transmembrana que ligam as células musculares à matriz extracelular), dando evidências da eficácia dessa estratégia no tratamento da distrofia muscular de Duchenne. Em seguida, afim de elucidar se um sistema CRISPR-Cas9

poderia corrigir a duplicação de um exon no gene DMD, fibroblastos afetados foram induzidos a diferenciação em mioblastos e transduzidos com um vetor de expressão lentiviral com um RNA guia contra o locus afetado e Cas9. Cerca de 50% das células transduzidas tiveram a duplicação removida. (WOJTAL et al., 2017)

4.3.4 Fenilcetonúria

A fenilcetonúria (PKU) é um erro inato do metabolismo do aminoácido fenilalanina (Phe) causado por mutações no gene *PAH*, codificante da enzima fenilalanina hidroxilase, afetando 1 em 15 mil nascidos. Mais de 950 mutações já foram descritas como causadoras da condição. A fenilalanina hidroxilase catalisa a transformação de Phe em tirosina. As mutações causam a perda da atividade enzimática, levando ao aumento nos níveis de fenilalanina e diminuição da síntese de tirosina, em decorrência disso, indivíduos afetados podem desenvolver deficiência intelectual, convulsões, microcefalia e outras complicações neurológicas. O tratamento atual consiste na restrição dietética de Phe e suplementação de tirosina (GONZÁLEZ et al., 2016).

Pan e colaboradores, em 2016, tranfectaram células da linhagem celular COS-7 (originadas de tecido renal de primatas do gênero *Chlorocebus*) mutadas com uma troca de nucleotídeo no gene *PAH* e incapazes de produzir fenilalanina hidroxilase com vetores de expressão com RNA guias contra o locus mutado e uma Cas9 inativada ligada a uma endonuclease FokI (cuja clivagem promove uma melhor taxa de reparo homólogo). As células positivas para a expressão das endonucleases e sgRNAs receberam oligodesoxinucleotídeos de fita simples como template de reparo afim de editar o gene *PAH* mutado a sua forma selvagem, o que levou a uma correção de 26,7% das células transfectadas. (PAN et al., 2016)

4.3.5 Doença de Huntington

Segundo Dayalu e Albin (2015), a doença de huntington (DH) é uma doença genética hereditária autossômica dominante neurodegenerativa. Pessoas de descendência europeia são as mais afetadas; sendo que se estima que 15 a cada 100 mil pessoas tenham alguma mutação que cause a patologia. A idade média de diagnóstico é 40 anos, sendo que a grande maioria dos pacientes morre em menos de 20 anos após o início dos sintomas. As mutações causadoras de HD consistem em um aumento no número de repetições “CAG” no gene HTT, codificante da proteína huntingtina, cuja função ainda é incerta, mas pensa-se estar relacionada a regulação da expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro e está associada à vesículas e microtúbulos celulares. Quanto maior o número de repetições, mais cedo a doença se manifesta. Alelos com mais de 27 repetições são notoriamente instáveis, e geralmente ganham mais repetições com o tempo, desta forma gerações posteriores podem ser afetadas por DH.

Classicamente, a doença de Huntington tem sintomas que podem ser classificados como motores, cognitivos e comportamentais. No início das manifestações, percebe-se mudanças sutis na personalidade, cognição e habilidades físicas como movimentos aleatórios irregulares. A deteriorização motora contínua se demonstra por rigidez, contorções e distonia seguida de dificuldade de deglutir, mastigar e falar. Com o tempo, habilidades cognitivas como planejamento, abstração, percepção de normas sociais e regras são debilitadas. Somados a problemas de memória de curto e longo prazo, processual, os sintomas neurológicos evoluem até demência. Também é frequentemente observado em pacientes de HD o desenvolvimento de sintomas neuropsiquiátricos como depressão, ansiedade, egocentrismo, comportamento compulsivo e vícios como alcoolismo e sintomas de tecidos periféricos, como atrofia muscular, osteoporose e insuficiência cardíaca. O tratamento atual consiste em diminuir a severidade dos sintomas, contudo ainda não se é capaz de deixar progressão da doença mais lenta ou curar a DH. (ROSS et al., 2014)

Em 2017, Xu e colaboradores, afim de corrigir a mutação responsável pela doença de huntington em células-tronco pluripotentes induzidas originadas de um paciente de HD, desenvolveram uma dupla de sgRNAs contra o locus das repetições “CAG” no gene HTT. As células foram transfectadas com vetores de expressão dos RNA guias e Cas9 nickase, um plasmídeo contendo a sequência selvagem do gene HTT como template de reparo, além de um plasmídeo reporter para a resistência a puromicina. Das 129 colônias resistentes, 14 tiveram a mutação corrigida, sendo que a atividade off-target foi muito baixa. Em seguida, as células-tronco tiveram sua capacidade de diferenciação testada. Depois de 15 dias de indução, as células se diferenciaram de forma bem sucedida em progenitoras neurais, e após 48 dias, as células foram diferenciadas em neurônios GABAérgicos. Foi observado que as células progenitoras neurais eram capazes de formar rosetas neurais (tipo de organização celular análoga ao neuroectoderma primordial), em contraste com outras células-tronco de pluripotência induzida com mutações no gene HTT. Como pacientes de DH tem alguns genes cuja expressão é prejudicada pela função alterada de huntingtina, foi feita uma comparação entre a expressão do gene CHCHD2 em células editadas e não-editadas, onde se constatou um significativo aumento da expressão desse gene em células com a mutação corrigida.

A eficiência da edição do gene HTT *in vivo* por um sistema CRISPR-Cas9 foi estudada por Monteys e colegas no mesmo ano. Primeiramente, fibroblastos contendo um alelo mutante causador de DH, receberam vetores de expressão de Cas9 e um sgRNA contra o locus da mutação ou apenas vetores de Cas9. Análises moleculares confirmaram a clivagem enzimática e redução da expressão da proteína mutante. Em seguida, camundongos BachHD (modelo animal de doença de huntington) foram injetados no hemisfério cerebral direito com vetores AAV de Cas9 e sgRNA e o hemisfério esquerdo não recebeu vetores, de modo a servir como controle. Após 3 semanas os cérebros dos animais foram colhidos analisados molecularmente. O hemisfério direito, em comparação ao esquerdo, demonstrou clivagem no gene HTT e mRNAs HTT reduzidos. (MONTEYS et al., 2017)

4.4 EDIÇÃO EM PLANTAS

Segundo Paul e Qi (2016), cada vez mais a população mundial depende da agricultura, e com isso existe uma demanda por vegetais com crescimento mais eficiente, maior resistência as intempéries e pragas. O entendimento da biologia básica por trás desses fatores ditará o desenvolvimento de melhores plantações. O sistema CRISPR-Cas pode ser utilizado para realizar a edição genômica em plantas afim de lhe conferir atributos vantajosos, como resistência a vírus e herbicidas.

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos vegetais de maior importancia econômica e alimentícia na maior parte do mundo, sendo sua modificação genética de grande interesse comercial. Xie e Xang (2013), editaram o gene OsMPK5 que codifica uma proteína quinase ativada por mitógeno, envolvida na resposta de defesa da planta e estresse abiótico. 3 sgRNAs contra sequências do gene OsMPK5 foram desenvolvidos e transfetados por meio de vetor de expressão em protoplastos (células sem parede celular) de arroz juntamente com a Cas9 e um promotor 35S de vírus do mosaico da couve-flor e um plasmídeo contendo um gene GFP como marcador de transfecção. 3 dias após a transfecção, cerca de 90% dos protoplastos eram positivos para GFP, nesses, a taxa de clivagem da Cas9 variou de 1,7% para o RNA guia PS2, 4,9% para PS1 e 10,6% para PS3. Análises de bioinformática demonstraram que no genoma do arroz, 7 sequências era similares a sequência-alvo de PS3 e possuíam PAM, estando sujeitas a atividade da Cas9 e estimaram que 90% dos genes do arroz podia ser alvo de RNA guias.

Sun e colaboradores buscaram conferir resistência contra herbicidas a tal planta, em 2016. O gene ALS do arroz codifica um peptídeo que é alvo de herbicidas como *bispirabac-sodium* e *clorosulfuron* e uma possível edição em tal gene pode promover resistência aos mesmos. Partindo disso, células de arroz foram co-transfectadas via biobalística (bombardamento de biomoléculas) com plasmídeos contendo 2 sgRNAs contra sequências do gene ALS e oligonucleotídeos de fita-simples contendo sequências as quais se desejava editar, como template de reparo, além da Cas9. De 320 células bombardadas, 116 sobreviveram a seleção por *bispirabac-sodium*, das

quais 52 foram aleatoriamente selecionadas e analisadas molecularmente. Todas as células sequenciadas sofreram reparo homólogo, contudo, no local de clivagem de um dos sgRNAs houve a geração de 3 distintos haplótipos, sendo 1 desses o esperado após o reparo com o DNA doador, e 2 possuíam polimorfismos de um único nucleotídeo idênticos ao gene ALS selvagem. Afim de determinar se plantas derivadas das células editadas realmente possuíam resistência ao herbicida, tanto plantas com alelos selvagem originadas de culturas celulares que não sofreram seleção quanto plantas editadas foram borrifadas com bispirabac-sodium. 10 dias após a aplicação do herbicida, as folhas das plantas não editadas começaram a secar, enquanto as folhas das plantas editadas não apresentaram efeito. 36 dias depois da aplicação, as plantas controles morreram, enquanto que as editadas cresciam normalmente. (SUN et al., 2016)

O tomate (*Solanum lycopersicum*) é um bom candidato para se testar a edição por CRISPR-Cas, pois tem um genoma diplóide que já fora completamente sequenciado, além tem grande importância econômica. Sabendo disso, Brooks et al (2014), desenvolveram 2 sgRNAs contra sequências do gene SIAGO7 (que codifica RNAs interferentes), cuja disfunção sabidamente leva a formação de folhas em forma de agulha ou enroladas em contrastes com folhas normais achatadas. 29 plântulas foram infectadas por plasmídeos de *Agrobacterium tumefaciens* contendo a Cas9 e sgRNAs, sendo que 9 semanas depois, 48% das plantas demonstravam fenótipos advindos da edição pela Cas9. Posteriormente, afim de testar a capacidade das plantas em transmitir as edições para sua progenia, o pólen de plantas que sofreram a mutação homozigota foi usado para fertilizar flores com o alelo selvagem e demonstrou-se que as plantas geradas eram heterozigotas para a mutação

Foram desenvolvidos 2 RNA guias contra sequências do gene de tomate ANTI1, codificante do fator de transcrição Myb, que quando demasiadamente expresso resulta em acumulação de antocianina e coloração roxa na planta. Embriões de tomate receberam através de um vetor de expressão luteoviral de Cas9, sgRNAs e um template de reparo contendo a sequência do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (para aumentar a expressão de ANTI1) e um gene de resistência a

canamicina. Após 2 semanas, já era possível perceber manchas roxas em 75% dos cotilédones dos embriões. Contudo nenhum ponto roxo fora observado sem a seleção por canamicina, concluindo-se que as células não editadas se replicam com maior eficiência (CERMÁK et al., 2015).

Muitas plantações sofrem grandes perdas de produção por conta de infecções virais, muitas vezes gerando grandes consequência econômicas e colocando a segurança alimentar em risco. Vírus de DNA da família *Geminiviridae* são alguns dos principais agentes infecciosos de plantas. A possibilidade de se conferir imunidade molecular contra vírus de DNA utilizando um sistema CRISPR-Cas através de sgRNAs contra sequências do genoma do vírus do frisado amarelo do tomateiro (TYLCV) juntamente com a Cas9 foram transduzidas através de um vetor de expressão viral em exemplares de *Nicotiana benthamiana* (planta próxima ao tabaco). 7 dias após a transdução as plantas foram infectadas por TYLC. Contatou-se que em folhas que receberam os vetores contendo a Cas9 e sgRNAs, a titulação viral era menor se comparadas a folhas controle que receberam apenas a Cas9, 10 dias após infecção. Posteriores análises indicaram mutações características de reparo não-homólogo, ou seja, a inibição da replicação viral se deu pela sua inativação, e não por interferência da Cas9 no maquinário de replicação celular. Os sintomas da infecção das plantas transduzidas foram atenuados, em comparação as plantas controle (ALI et al., 2015).

Com o objetivo de também conferir imunidade contra geminivírus à *Arabidopsis thaliana* (pertencente a família da mostarda) e *N. benthaminia* através de uma sistema CRISPR-Cas, Ji et al (2015) , criaram sgRNAs contra sequências do genoma do vírus do broto crespo da beterraba (BSCTV). Folhas de *N. benthaminia* receberam vetores de expressão de Cas9 e sgRNAs (plantas controle receberam apenas vetores de Cas9) por agroinoculação (mediada por *Agrobacterium*), sendo que 2 dias após transfecção, as mesma folhas foram inoculadas com BSCTV também por agroinoculação. Após 10 dias, a sintomatologia casual da infecção foi observada em plantas controle, porém as folhas que receberam os vetores contendo sgRNAs foram menos afetadas. De 43 sgRNAs testados, 38 reduziram o DNA viral em mais de 60% e 20 em mais de 80% (inibição máxima de 97%). Como geminivírus se prolifera por toda a planta, espécimes

controle demonstraram sintomas em folhas não inoculadas, enquanto os sgRNAs mais eficientes conteram a infecção ao local de inoculação. Os sgRNAs que promoveram maior redução da carga viral foram transfetados em conjunto com a Cas9 em espécimes de *Arabidopsis thaliana* transgênicas que também foram inoculadas por BSCTV. 20 dias após a transfecção, plantas controle que não receberam os sgRNAs demonstravam sintomas severos da infecção por BSCTV, em contraste com plantas transfetadas, que demonstraram poucos ou nenhum sintoma aparente pela infecção.

As plantas não têm importância somente alimentícia, muitas espécies também são utilizadas na fabricação de cosméticos e fármacos, como a papoula-dormideira (*Papaver somniferum*) que é uma das principais plantas produtoras de opióides como a morfina, mas sua importância biomédica também se dá pela síntese de outros alcalóides de bencilisoquinolina como a codeína (antitussígena e analgésica), noscapina (anticancerígena), papaverina (espasmolítica). Buscando manipular a biosíntese dessas substâncias, Alagoz e colaboradores, em 2016, desenvolveram um RNA guia contra o gene da papoula-dormideira 4OMT2, envolvido na regulação da produção desses alcalóides. Células de folha de papoula foram transfetadas com vetores de expressão de Cas9 e sgRNA, sendo a transfecção mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. 28 clones celulares foram analisados molecularmente, se detectando que 24 haviam sofrido clivagem pela Cas9. Apenas um local de possível atividade *off-target* foi identificado, no gene 4OMT1, que possui grande homologia com 4OMT2. Posteriores análises demonstraram uma significativa redução na produção de alcalóides em células transfetadas, em relação a células não-transfetadas (ALAGOZ et al., 2016).

4.5 CRIAÇÃO DE ORGANISMOS MODELOS E LINHAGENS CELULARES

Um organismo modelo é toda espécie que não a humana, que é extensivamente estudada em diversos aspectos biológicos de maneira que ele se torna útil para a obtenção de informações sobre fenômenos que não podem ser estudados diretamente,

como a atividade de um fármaco em certa patologia humana. Para além disso, muito do conhecimento sobre os aspectos essenciais do funcionamento de uma célula viva só pode ser obtido pelo estudo de organismos modelos. Contudo, o uso de certos organismos em pesquisas, principalmente animais, esbarra em diversos dilemas éticos, muitas vezes limitando a extensão de estudos clínicos. O uso de linhagens celulares específicas muitas vezes pode contornar problemas éticos, contudo, os estudos que as utilizam acabam por não cobrir aspectos sistêmicos. Um dos empregos do sistema CRISPR-Cas pode ser a criação de organismos modelos ou linhagens celulares mais fidedignos às condições, como as doenças humanas, realizando edições genômicas que por consequência alteram fenótipos. (FIELDS e JOHNSTON, 2005; GOLDSMITH, 1993; PELAGATTI et al., 2015)

A criação de um modelo animal geneticamente e fenotipicamente semelhante à distrofia muscular de Duchenne humana foi explorada por Nakamura e colaboradores em 2014. Zigotos de ratos Wistar-Imamichi foram injetados com 2 sgRNAs (1 contra o exon 3 e 1 contra o exon 16 do gene *Dmd* de rato) e RNA mensageiro (mRNA) de Ca9. De 10 ratos machos que receberam os sgRNAs, 9 demonstraram mutação de pelo menos 1 dos 2 loci alvo. Análises moleculares e de imunocoloração indicaram que ratos com mutações *in-frame* expressão uma distrofina *truncated* em quantidades menores que as normais, e ratos com mutações *out-frame* não expressão distrofina. Os animais editados tinham um peso do músculo tibial anterior e coração maior que ratos com o alelo selvagem, indicando a falta da distrofina. Todos os ratos mutados demonstraram degeneração muscular e fibrose, além de diferença no tamanho das fibras musculares, característico da DMD humana. Diferente de pacientes da distrofia, os ratos não tiveram a reposição das fibras musculares por adipócitos. Também foram detectadas lesões degenerativas no coração e diafragma dos ratos mutados. A hereditariedade das mutações foi testada com o cruzamento de ratas editadas (F0) com ratos com o alelo selvagem de *Dmd*. A prole tinha mutações detectáveis, sendo que todos tinham uma expressão de distrofina reduzida. Ratos F1 demonstraram um aumento do músculo tibial anterior e lesões degenerativas nas fibras musculares, além da diminuição da formação de complexos de glicoproteínas e distrofina, ou seja as mutações podem ser herdadas com sucesso. Em comparação com camundongos

modelos de DMD, os ratos editados demonstraram uma progressão da doença mais contínua, lesões cardíacas mais severas e aumento do tecido adiposo entre músculos, semelhante a forma humana de DMD (NAKAMURA et al., 2014).

Algumas vezes, camundongos possuem grandes limitações como animais modelos de certas doenças humanas, como no caso da doença de von Willebrand (vWD), condição hemorrágica hereditária, caracterizada pela deficiência do fator de von Willebrand (envolvido na manutenção da hemostasia). Um modelo animal ideal para essa patologia deve ter o tamanho de órgãos e sistema circulatório similar ao de humanos, para ter mais afinidade fenotípica e resposta ao tratamento mais similar. Buscando criar um modelo de porcos para a vWD, Hai e colaboradores, em 2014, desenvolveram um RNA guia contra o exon 5 do gene *vWF* (codificante do fator de von Willebrand) de porcos. Embriões de porcos foram injetados com plamídeos de expressão da Cas9 e RNA guia ou água. O desenvolvimento de todos os embriões foi similar, ou seja, a manipulação por microinjeção não afetou o curso embrionários. Os 76 embriões que receberam plamídeos foram transferidos para 5 porcas afim de gerar filhotes mutados. Dessas porcas, 3 ficaram prenhes e tiveram um total de 16 filhotes. Análises moleculares demonstraram que 63% da prole tinham mutações no locus alvo do RNA guia, sendo 6 filhotes bialélicos para mutações no gene *vWF*. A maioria desses filhotes tinham mais de um tipo de mutação no gene *vWF*, sugerindo que a Cas9 teve atividade em diferentes estágios embrionários, diferente de TALENs e ZFNs. Apenas 2 filhotes morreram prematuramente, sugerindo pouca toxicidade dos plamídeos durante o desenvolvimento embrionário. Nos porcos mutantes bialélicos, fora detectada a quase total ausência do fator de von Willebrand sérico e expressão nos pulmões. Da mesma forma que indivíduos acometidos por vWD, os porcos bialélicos tiveram uma redução no fator de coagulação VIII, que é degradado na ausência de vWF. O tempo de sangramento de porcos com o alelo selvagem era de cerca de 34 minutos, comparados aos 512 minutos em média em porcos mutados bialelicamente. O sequenciamento das gônadas da prole detectou a mutação em mais de 50% das células ovarianas e 100% das células testiculares analisadas, indicando que a mutação pode ser transmitida à próxima geração. Não fora detectada atividade *off-target* de Cas9 em porcos mutados (HAI et al., 2014).

Outro animal que se buscou estudar utilizando um sistema CRISPR-Cas foi o coelho, em experimento conduzido por Honda e colaboradores em 2015. O gene escolhido para o experimento foi o codificante da tirosinase, enzima envolvida na síntese de melanina, denominado *Tyr*. Foi desenvolvido um sgRNA contra o primeiro exon de tal gene, que juntamente com a Cas9, foram codificados em plasmídeos pX330 e microinjetados diretamente em prónucleos de zigotos de coelho. Um total de 67 embriões foram transplantados em coelhas JW com pseudociese (presença de sintomas de gravidez na ausência de fecundação). Deste, 9 se desenvolveram até o parto. Apenas 2 dos filhotes foram editados, sendo que uma de pelagem normal, de mutação heterozigota e um albino natimorto, com a mutação homozigota. Dos filhotes com alelos selvagens, 2 também morreram prematuramente. Nenhuma atividade *off-target* da Cas9 nos 5 locos semelhantes a sequência-alvo do sgRNA detectados foi encontrada nos filhotes em análises moleculares. O coelho JW heterozigoto foi posteriormente cruzado com uma coelha de pelagem mista (contendo também uma mutação heterozigota), sendo que sua prole possuía filhotes albinos, confirmando a transmissão da mutação mediada por Cas9 à progênie (HONDA et al., 2015).

Como explorado anteriormente com tumores surgidos pela infecção pelo HPV, um sistema CRISPR-Cas pode ser utilizado contra genes envolvidos no surgimento de cânceres. O gene PTEN é um gene supressor de tumor que codifica uma proteína homônima, sendo um dos genes mais mutados em cânceres esporádicos (sem fator hereditário) e em pacientes com síndromes que causam predisposição ao desenvolvimento de cânceres, sendo também envolvido na manutenção da homeostasia hepática, carcinogênese hepática e metabolismo lipídico, como indicado em estudos com modelos animais existentes para deficiência de *Pten*. Wang e colaboradores, em 2015, transduziram camundongos com vetores de expressão virais adeno-associados de Cas9 e um sgRNA contra o gene *Pten* de camundongo por meio de injeção hidrodinâmica na calda dos animais (com 8 semanas de idade), sendo que um grupo controle receberia GFP no lugar do sgRNA. Os animais foram eutanasiados em diferentes intervalos para avaliar a eficiência da edição por Cas9 e mudanças fenotípicas no fígado dos camundongos. Em 2 animais eutanasiados após 2 semanas depois da injeção, a taxa de indels no loco alvo foi de cerca de 18,8%. Depois de 1 mês

após o tratamento, uma diminuição de imunocoloração de Pten fora observada no fígado dos animais. Após 4 meses, um drástico quadro de hepatomegalia e esteatose hepática (acúmulo de gordura no fígado) fora observado. O uso de vetores de expressão virais adeno-associados demonstrou uma edição mais eficiente que em estudos similares que utilizaram plasmídeos de DNA, sendo que a Cas9 e sgRNAs eram expressos por mais tempo, contudo, Wang e colegas relataram que esse meio de transdução induz a uma resposta imune do organismo, com aumento da produção de citocinas e transaminases hepáticas e anticorpos contra a Cas9, resultando na diminuição de células hepáticas transduzidas (WANG et al., 2015).

Partindo do princípio que a edição em genes envolvidos no surgimento de neoplasias podia ser mediada pela Cas9, Maresch e colaboradores, em 2015, buscaram desenvolver um modelo de camundongos para adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) através da edição por CRISPR-Cas, uma vez que os modelos animais atuais possuem pouca especificidade tecidual em seus genes editados. Laparotomia (incisão para acesso a cavidade abdominal) foi realizada em camundongos, e em seguida seus pâncreas foram diretamente injetados com 15 tipos de plasmídeos px330, cada um contendo a Cas9 e um sgRNA contra gene supressor de tumor diferente, como por exemplo o gene de camundongo *Kras*, cuja mutação em seu correspondente humano está presente em 90% de cânceres pancreáticos. Após injeção os pâncreas dos animais foram eletroporados para permitir a transfecção das células pancreáticas pelos plasmídeos. Essa técnica de transfecção foi selecionada pois transduções com vetores de expressão virais não permitem abordagens multiplex nessa escala. Camundongos controle foram transfectados com 2 sgRNAs contra íntrons do locus *Rosa26*. O desenvolvimento tumoral dos animais foi monitorado por ressonância magnética, sendo que o aparecimento de câncer pancreático nos camundongos começou na quarta semana após a eletroporação, 7 dos 13 animais transfectados tinham tumores vinte e quatro semanas após eletroporação, sendo que o grupo controle não apresentou qualquer sinal de neoplasia. Os tumores variaram histologicamente e metastases hepáticas foram detectadas. Posteriores análises indicaram indels em diversos os genes alvo, sendo compostos 90% por deleções e 10% por inserções promovidas por reparo não-homólogo. Sequenciamento genético dos

tumores demonstrou que de 7 a 14 genes dos 15 genes alvo foram editados nos animais que desenvolveram câncer pancreático, ou seja, o sistema CRISPR-Cas9 multiplex foi eficiente. Nenhuma atividade *off-target* foi detectada em sequência com certa homologia as sequências-alvo. É preciso salientar, contudo, que o PDAC humano é causado principalmente por translocações cromossômicas e não por simples deleções nos genes, ou seja, se imagina que a instabilidade genômica seja um fator importante nessa condição (MARESCH et al., 2015).

É notável que uma grande vantagem de se usar um sistema CRISPR-Cas para criar modelos animais é a drástica diminuição de tempo e recursos necessários para tal fim. Contudo, até recentemente poucos estudos lidaram com a falta de especificidade em relação a atividade e expressão da Cas9. Levando isso em consideração, Carroll e colaboradores buscaram criar camundongos transgênicos que expressavam a Cas9 apenas em cardiomiócitos em 2016. Zigotos de camundongo foram transduzidos com um vetores virais adeno-associados expressando a Cas9 e proteínas de fluorescência (GFP e TdTomato) como marcadores da expressão de Cas9. O promotor CBh, presente em vetores virais adeno-associados, foi trocado por um promotor do gene *Myh6* de camundongo (codificante de uma isoforma de miosina cardíaca presente principalmente nos átrios) , desta forma fazendo com que a Cas9 fosse expressa apenas em cardiomiócitos. A expressão de Cas9 foi acentuada no coração, mas não em outros tecidos dos animais transduzidos, sendo detectada em todos os cardiomiócitos analisados. Tal expressão não demonstrou nenhum efeito nocivo nos animais. Posteriormente, quando estavam com 10 dias de idade, os camundongos foram injetados intraperitonealmente com vetores de expressão virais adeno-associados contendo um sgRNA contra o gene *Myh6* e uma proteína fluorescente como marcadora de expressão do sgRNA (ZsGreen) ou salina como controle. Após cinco semanas, cerca de 75% dos animais expressavam a ZsGreen, sendo que fora observada hipertrofia cardíaca, dilatação de átrios e ventrículos, afinamento das paredes ventriculares e fibrose, enquanto animais controle demonstraram corações normais. Os cardiomiócitos de animais editados se apresentaram com morfologia irregular e aumentados, indicando insuficiência cardíaca. Este estudo prova de conceito sugere que a aplicação de sistemas CRISPR-Cas podem ser específicas para certos tecidos ou

células e demonstra a possibilidade da criação de modelos animais para condições cardíacas (CAROLL et al., 2016)

Como dito anteriormente, muitas vezes questões éticas podem inviabilizar o estudo com animais e o desenvolvimento de linhagens celulares específicas para o estudo de certas condições médicas podem se demonstrar como solução para tais dilemas, para isso, claro, se dá a necessidade de novas técnicas biotecnológicas para que células mimetizem condições fisiológicas ou fisiopatológicas, sendo uma delas o tema desse trabalho (MUNHOZ et al., 2014). Mandai e colaboradores, em 2015, desenvolveram uma linhagem celular humana onde um SNP (rs3754777) fora introduzido no gene STK39, que sabidamente está envolvido na surgimento da hipertensão arterial idiopática. Tal gene codifica uma enzima quinase que se presume estar envolvida na resposta ao estresse celular. Células HEK293T foram transfectadas com plamídeos contendo a Ca9, plamídeos com um sgRNA contra o gene STK39 e um ssODN contendo a troca de nucleotídeo desejada. A edição ocorreu da forma esperada em boa parte das células, se estabelecendo uma linhagem celular homocigota e uma heterocigota. Fora detectado uma expressão elevada do gene STK39 em ambas linhagens celulares e em consequência um aumento da fosforilação e ativação de SPAK (proteína quinase) e NKCC1 (co-transportador de sódio, potássio e cloro), o que elevaria a pressão arterial (MANDAI et al., 2015)

Linhagens celulares modificadas geneticamente podem ter diversas aplicações, como a edição genética de linfócitos T que é uma estratégia promissora para terapias celulares contra o câncer, doenças autoimunes e infecção por HIV, contudo vem demonstrando grandes desafios. Recentemente, em 2015, células T CD4⁺ humanas tiveram os genes CXCR4 (codificante de um co-receptor de nome homônimo para HIV, envolvido na hematopoiese) e PD-1 (codificante do receptor proteína de morte celular programada 1) editados por CRISPR-Cas em um experimento realizado por Schumann e colaboradores. Diferentemente de outros estudos onde plamídeos de DNA foram usados para a transfecção celular de Ca9 e sgRNAs, os linfócitos T CD4⁺ receberam complexos de Ca9 e sgRNA, denominados ribonucleoproteína Ca9, diretamente através de eletroporação. O sgRNA desenvolvido tem a região exônica do gene CXCR4

como alvo. A eletroporação teve certa eficiência em promover a edição do gene alvo, onde cerca de 40% das células sofreram indels mediados por reparo não-homólogo no locus alvo. Tais células tiveram acentuada diminuição na expressão do co-receptor, comparadas à células controle que receberam apenas a Ca9. Foi observada que a taxa de clivagem era diretamente proporcional a dose eletroporada de ribonucleoproteínas. Em seguida, a edição do gene CXCR4 por reparo homólogo foi testada. Novas células T CD4+ receberam as ribonucleoproteínas Ca9 e ssODNs afim de inserir um sítio de clivagem para a enzima de restrição HindIII na sequência-alvo do sgRNA, incluindo o PAM para evitar posterior clivagem pela Ca9. Cerca de 25% das células sofreram reparo homólogo quando a concentração de ssODNs era de 50pmol e 21% quando 100 pmol, em concentração de 200 pmol, a edição foi menor ainda, indicando possível citotoxicidade. Experimentos semelhantes foram realizados substituindo o sgRNA contra CXCR4 por um contra o gene PD-1, cuja expressão em linfócitos T cronicamente ativados pode levar à inibição da atividade antitumoral dessas células, sendo que anticorpos monoclonais contra o receptor proteína de morte celular programada 1 são usados no tratamento de cânceres. Como esperado, as células tiveram uma redução significativa na expressão do gene PD-1. Análises moleculares demonstraram que a edição total foi de cerca de 11% e reparo homólogo (inserindo o sítio de clivagem de HindIII) ocorreu em cerca de 3% das células. (SCHUMANN et al., 2015).

4.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Nessa revisão, foram abordados diversos fins para a utilização do sistema CRISPR-Cas, porém, questões como a modulação da expressão gênica e a edição de zigotos humanos, teoricamente já possíveis com a técnica, levarão a dilemas éticos inevitáveis. Atualmente se têm um aumento quase exponencial no número experimentos com CRISPR-Cas, tendência a ser mantida nos próximos anos. O aperfeiçoamento da técnica vem acontecendo de maneira muito rápida, onde podemos prever que dentro de algumas décadas e adjunta de outras tecnologias, seu potencial será, em questões práticas, quase ilimitado.

Dados os recursos e legislação necessários, a eugenia, em sua essência, será possível. A partir desse cenário, as consequências sociais são imprevisíveis. Será necessário que a utilização da engenharia genômica humana seja conduzida de maneira extremamente sábia por cientistas e profissionais da saúde nesse futuro não tão longínquo, a fim de evitar que cenário de “discriminação genética”, onde ricos acabam por ser fisiologicamente superiores aos que não tem acesso as tecnologias de biologia molecular, como explorado no famoso filme “Gattaca” de Andrew Niccol (1997), deixem de ser apenas ficção. As possibilidades trazidas com a descoberta do sistema CRISPR-Cas devem enfaticamente servir para a melhoria da saúde e qualidade de vida de toda a população humana.

5. CONCLUSÃO

Os estudos sobre o funcionamento e aplicabilidade do sistema CRISPR-Cas ainda estão em sua infância, com muitas perguntas fundamentais a serem respondidas. Contudo, como demonstrado nessa revisão bibliográfica, sua relativa baixa complexidade e custo permitiu que um grande número de centros de pesquisa ao redor do mundo começassem a explorar a técnica para diversos fins, levando a obtenção de informações vitais sobre seu maquinário bioquímico e molecular numa escala de tempo muito pequena. Quando se leva em consideração a aplicação da técnica de maneira bruta e sem metodologias ainda bem definidas, os resultados atingidos pelos diversos experimentos em uma grande gama de áreas científicas relatados nesse trabalho, servem claramente como um indicativo de que o sistema CRISPR-Cas se tornará uma ferramenta revolucionária na edição genômica num futuro presente.

É de suma importância, entretanto, que haja um comparativo entre a eficiência de métodos de entrega da Cas9, sgRNAs e DNA doador aos diversos tipos celulares (que podem ser baseados em plasmídeos, vetores virais ou técnicas físicas) e detecção de sequências alvo para posterior padronização metodológica. Atualmente os métodos são extremamente variados, o que impede um comparativo direto de resultados de estudos semelhantes.

Estudos *in vivo* e *ex vivo* demonstraram que, dada uma melhor escolha das sequências alvo, levando ao desenvolvimento de sgRNAs mais específicos a serem usados, a atividade *off-target* da Cas9, uma das maiores preocupações para o futuro uso clínico ou comercial da técnica, fora muito reduzida, por vezes negligenciável. É claro, porém, que para que ocorra a edição em humanos ou embriões, a clivagem mediada por endonucleases necessita ser perfeitamente precisa. Caso contrário, riscos como a carcinogênese tornarão certas aplicações do sistema CRISPR-Cas inviáveis.

A modificação da Cas9, que já fora realizada em alguns estudos, pode conferir a enzima maior especificidade e reconhecimento de mais tipos de PAMs, assim mitigando ainda mais a possível clivagem *off-target* e expandindo o número genes passíveis de serem editados pela técnica.

REFERÊNCIAS

- ALAGOZ, Yagiz et al. Manipulating the Biosynthesis of Bioactive Compound Alkaloids for Next-Generation Metabolic Engineering in Opium Poppy Using CRISPR-Cas 9 Genome Editing Technology. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.345-351, 3 ago. 2016. Springer Nature.
- ALI, Zahir et al. Mahfouz. CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. **Genome Biology**, v.16, n.1, 2015.
- ALLISON, Anthony C. Genetic control of resistance to human malaria. **Current Opinion In Immunology**, [s.l.], v. 21, n. 5, p.499-505, out. 2009. Elsevier BV.
- AUBERT, Martine et al. In vitro Inactivation of Latent HSV by Targeted Mutagenesis Using an HSV-specific Homing Endonuclease. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [s.l.], v. 3, p.345-355, jan. 2014. Elsevier BV.
- AUDISIO, Riccardo A. et al. Public health value of universal HPV vaccination. **Critical Reviews In Oncology/hematology**, [s.l.], v. 97, p.157-167, jan. 2016. Elsevier BV.
- BAKONDI, Benjamin et al. In Vivo CRISPR/Cas9 Gene Editing Corrects Retinal Dystrophy in the S334ter-3 Rat Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.556-563, mar. 2016. Elsevier BV.
- BARRANGOU, R. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science**, Washington, v. 315, p.1709-1712, 2007.
- BASSUK, Alexander G. et al. Precision Medicine: Genetic Repair of Retinitis Pigmentosa in Patient-Derived Stem Cells. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.333-344, 27 jan. 2016. Springer Nature.
- BROOKS, C. et al. Efficient Gene Editing in Tomato in the First Generation Using the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated9 System. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 166, n. 3, p.1292-1297, 15 set. 2014. American Society of Plant Biologists (ASPB).
- CARROLL, D. Genome engineering with targetable nucleases. **Annu Rev Biochem**, v. 83, p. 409–439, 2014.
- CARROLL, Kelli J. et al. A mouse model for adult cardiac-specific gene deletion with CRISPR/Cas9. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 113, n. 2, p.338-343, 30 dez. 2015. Proceedings of the National Academy of Sciences.
- ČERMÁK, Tomáš et al. High-frequency, precise modification of the tomato genome. **Genome Biology** v.17 n.1, 2015.
- CHATZISTAMATIOU, Kimon et al. Diagnostic accuracy of high-risk HPV DNA genotyping for primary cervical cancer screening and triage of HPV-positive women, compared to cytology: preliminary results of the PIPAVIR study. **Archives Of**

Gynecology And Obstetrics, [s.l.], v. 295, n. 5, p.1247-1257, 23 mar. 2017. Springer Nature.

CHEN, Weizao; YING, Tianlei; DIMITROV, Dimiter S. Antibody-based candidate therapeutics against HIV-1: implications for virus eradication and vaccine design. **Expert Opinion On Biological Therapy**, [s.l.], v. 13, n. 5, p.657-671, 7 jan. 2013. Informa Healthcare.

CHENG, Man et al. Combination of the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated 9 technique with the piggybac transposon system for mouse in utero electroporation to study cortical development. **Journal Of Neuroscience Research**, [s.l.], v. 94, n. 9, p.814-824, 18 jun. 2016. Wiley-Blackwell.

CHIOU, Shin-heng et al. Pancreatic cancer modeling using retrograde viral vector delivery and in vivo CRISPR/Cas9-mediated somatic genome editing. **Genes & Development**, [s.l.], v. 29, n. 14, p.1576-1585, 15 jul. 2015. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

CHO, J.; PARKS, M. E.; DERVAN, P. B.. Cyclic polyamides for recognition in the minor groove of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v. 92, p. 10389–10392, 1995.

CHOULIKA A. et al. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell Biol.**, Washington, v. 15, p. 1968–1973, 1995. Bimensal

DAYALU, Praveen; ALBIN, Roger L.. Huntington Disease. **Neurologic Clinics**, [s.l.], v. 33, n. 1, p.101-114, fev. 2015. Elsevier BV.

DIEMEN, Ferdy R. et al. CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing of Herpesviruses Limits Productive and Latent Infections. **Plos Pathogens**, [s.l.], v. 12, n. 6, p.300-310, 30 jun. 2016. Public Library of Science (PLoS).

DOMINGUEZ, Antonia A.; LIM, Wendell A.; QI, Lei S.. Beyond editing: repurposing CRISPR–Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, [s.l.], v. 17, n. 1, p.5-15, 16 dez. 2015. Springer Nature.

DONG, Chunsheng et al. Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication. *Antiviral Research*, [s.l.], v. 118, p.110-117, jun. 2015. **Elsevier BV**.

DOUDNA, Jennifer A.; CHARPENTIER, Emmanuelle. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas. **Science**, Washington, v. 346, n. 6213, nov. 2014. Semanal.

DOW, Lukas E.. Modeling Disease In Vivo With CRISPR/Cas9. **Trends In Molecular Medicine**, [s.l.], v. 21, n. 10, p.609-621, out. 2015. Elsevier BV.

EWITT, M. A. et al. Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. **Science Translational Medicine**, [s.l.], v. 8, n. 360, p.360-371, 12 out. 2016. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

FERREIRA, Marcelo Simão. Diagnóstico e tratamento da hepatite B. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba , v. 33, n. 4, p. 389-400, Aug. 2000 .

FIELDS, S.. CELL BIOLOGY: Whither Model Organism Research?. **Science**, [s.l.], v. 307, n. 5717, p.1885-1886, 25 mar. 2005. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

GELTZ, Joshua J.; GERSHBURG, Edward; HALFORD, William P.. Herpes Simplex Virus 2 (HSV-2) Infected Cell Proteins Are among the Most Dominant Antigens of a Live-Attenuated HSV-2 Vaccine. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.122-144, 6 fev. 2015. Public Library of Science (PLoS).

GOLDSMITH, E. Words and models (systems approach to linguistics). **Kybernetes**, v.4, n.1, p.243-249, 1993.

GONZÁLEZ, María Julieta et al. Impaired Neurotransmission in Early-treated Phenylketonuria Patients. **Seminars In Pediatric Neurology**, [s.l.], v. 23, n. 4, p.332-340, nov. 2016. Elsevier BV.

HAI, Tang et al. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. **Cell Research**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.372-375, 31 jan. 2014. Springer Nature. MARESCH, Roman et al. Multiplexed pancreatic genome engineering and cancer induction by transfection-based CRISPR/Cas9 delivery in mice. **Nature Communications**, [s.l.], v. 7, p.10770-10794, 26 fev. 2016. Springer Nature.

HEN, S et al. Harnessing the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated Cas9 system to disrupt the hepatitis B virus. **Gene Therapy**, [s.l.], v. 22, n. 5, p.404-412, 5 fev. 2015. Springer Nature.

HONDA, Arata et al. Single-step generation of rabbits carrying a targeted allele of the tyrosinase gene using CRISPR/Cas9. **Experimental Animals**, [s.l.], v. 64, n. 1, p.31-37, 2015. Japanese Association for Laboratory Animal Science.

HU, Zheng et al. Disruption of HPV16-E7 by CRISPR/Cas System Induces Apoptosis and Growth Inhibition in HPV16 Positive Human Cervical Cancer Cells. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2014, p.1-9, 2014. Hindawi Publishing Corporation.

HUANG, Xiaosong et al. Production of Gene-Corrected Adult Beta Globin Protein in Human Erythrocytes Differentiated from Patient iPSCs After Genome Editing of the Sick Point Mutation. **Stem Cells**, [s.l.], v. 33, n. 5, p.1470-1479, 23 abr. 2015. Wiley-Blackwell.

Jl, Xiang et al. Establishing a CRISPR–Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. **Nature Plants**, [s.l.], v. 1, n. 10, p.15144-15149, 28 set. 2015. Springer Nature.

JINEK, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, Washington, v. 337, n. 6096, p.816-821, ago. 2012.

KAMINSKI, R et al. Excision of HIV-1 DNA by gene editing: a proof-of-concept in vivo study. **Gene Therapy**, [s.l.], v. 23, n. 89, p.690-695, 19 maio 2016. Springer Nature.

KAMINSKI, Rafal et al. Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.123-130, 4 mar. 2016. Springer Nature.

KANG, Hyunjun et al. CCR5 Disruption in Induced Pluripotent Stem Cells Using CRISPR/Cas9 Provides Selective Resistance of Immune Cells to CCR5-tropic HIV-1 Virus. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [s.l.], v. 4, p.269-278, 2015. Elsevier BV.

KARIMOVA, Madina et al. CRISPR/Cas9 nickase-mediated disruption of hepatitis B virus open reading frame S and X. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.321-327, 3 set. 2015. Springer Nature.

KENNEDY, E. M. et al. Inactivation of the Human Papillomavirus E6 or E7 Gene in Cervical Carcinoma Cells by Using a Bacterial CRISPR/Cas RNA-Guided Endonuclease. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 88, n. 20, p.11965-11972, 6 ago. 2014. American Society for Microbiology.

KENNEDY, Edward M. et al. Suppression of hepatitis B virus DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease. **Virology**, [s.l.], v. 476, p.196-205, fev. 2015. Elsevier BV.

KENNEDY, Edward M.; KORNEPATI, Anand V.r.; CULLEN, Bryan R.. Targeting hepatitis B virus cccDNA using CRISPR/Cas9. *Antiviral Research*, [s.l.], v. 123, p.188-192, nov. 2015. **Elsevier BV**.

KLEINSTIVER, Benjamin P. et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. **Nature**, [s.l.], v. 523, n. 7561, p.481-485, 22 jun. 2015. Springer Nature.

KUMARASAMY, N. The impact of antiretroviral therapy in resource-limited settings and current HIV therapeutics. **Oral Diseases**, [s.l.], v. 22, p.42-45, abr. 2016. Wiley-Blackwell.

LEVIN, Bruce R. et al. The Population and Evolutionary Dynamics of Phage and Bacteria with CRISPR–Mediated Immunity. **Plos Genetics**, São Francisco, v. 8, n. 3, abr. 2013. Mensal.

LIJUAN, Yin; SIQI, Hu; FEI, Guo. The application of CRISPR-Cas9 gene editing technology in viral infection diseases. **Hereditas**. 2015.

LIN, Su-ru et al. The CRISPR/Cas9 System Facilitates Clearance of the Intrahepatic HBV Templates In Vivo. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, [s.l.], v. 3, p.186-195, jan. 2014. **Elsevier BV**.

LIU, Xing et al. Inhibition of hepatitis B virus by the CRISPR/Cas9 system via targeting the conserved regions of the viral genome. *Journal Of General Virology*, [s.l.], v. 96, n. 8, p.2252-2261, 1 ago. 2015. **Microbiology Society**.

MA, Ding et al. Disruption of human papillomavirus 16 E6 gene by clustered regularly interspaced short palindromic repeat/Cas system in human cervical cancer cells. **Oncotargets And Therapy**, [s.l.], p.37-45, dez. 2014. Dove Medical Press Ltd.

MAKAROVA, Kira S. et al. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 9, n. 6, p.467-477, 9 maio 2011. Springer Nature

MALI, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. **Science**, Washington, v. 339, n. 6121, p. 823–826, 2013.

MANDAI, S. et al. Generation of Hypertension-Associated STK39 Polymorphism Knockin Cell Lines With the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 System. **Hypertension**, 2015.

MATSA, Elena et al. Transcriptome Profiling of Patient-Specific Human iPSC-Cardiomyocytes Predicts Individual Drug Safety and Efficacy Responses In Vitro. **Cell Stem Cell**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.311-325, set. 2016. Elsevier BV.

MONTEYS, Alex Mas et al. CRISPR/Cas9 Editing of the Mutant Huntingtin Allele In Vitro and In Vivo. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.12-23, jan. 2017. Elsevier BV.

MUNOZ, Ivan M. et al. Improved Genome Editing in Human Cell Lines Using the CRISPR Method. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 10, p.567-578, 10 out. 2014. Public Library of Science (PLoS).

NAKAMURA, Katsuyuki et al. Generation of muscular dystrophy model rats with a CRISPR/Cas system. **Scientific Reports**. v.4 n.1, 2014.

NGO, Duyen; STEINBERG, Martin. Sickle cell disease. **Hematology**. 2014. W. S. Maney & Son Ltd.

OKONKO, I. O. et al. Serum HSV-1 and -2 IgM in Pregnant Women in Port Harcourt, Nigeria. **Journal Of Immunoassay And Immunochemistry**, [s.l.], v. 36, n. 4, p.343-358, 5 nov. 2014. Informa UK Limited.

OSTRIA-HERNÁNDEZ, Martha Lorena et al. Survey of clustered regularly interspaced short palindromic repeats and their associated Cas proteins (CRISPR/Cas) systems in multiple sequenced strains of *Klebsiella pneumoniae*. **BMC Research Notes**, Londres, v. 8, n. 332, ago. 2015.

PAN, Yi et al. CRISPR RNA-guided FokI nucleases repair a PAH variant in a phenylketonuria model. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.445-450, 27 out. 2016. Springer Nature.

PAUL, Joseph W. et al. CRISPR/Cas9 for plant genome editing: accomplishments, problems and prospects. **Plant Cell Reports**, [s.l.], v. 35, n. 7, p.1417-1427, 25 abr. 2016. Springer Nature.

PELLAGATTI, Andrea et al. Application of CRISPR/Cas9 genome editing to the study and treatment of disease. **Archives Of Toxicology**, [s.l.], v. 89, n. 7, p.1023-1034, 1 abr. 2015. Springer Nature.

PLESSIS A. et al., Site-specific recombination determined by I-SceI, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus. **Genetics**, Bethesda, v. 130, p. 451–460, 1992. Mensal.

- POLSTEIN, Lauren R; A GERSBACH, Charles. A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation. **Nature Chemical Biology**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.198-200, 9 fev. 2015. Springer Nature.
- RAHDAR, Meghdad et al. Synthetic CRISPR RNA-Cas9–guided genome editing in human cells. **PNAS**, Washington, v. 112, n. 51, nov. 2015. Semanal.
- RAMANAN, Vyas et al. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, p.10833-10843, 2 jun. 2015. Springer Nature.
- RATH, Devashish et al. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. **Biochimie**, Amsterdã, v. 117, p.119-128, abr. 2015.
- RODRIGUES, Daniela O.w. et al. Genetic determinants and stroke in children with sickle cell disease. **Jornal de Pediatria**, [s.l.], v. 92, n. 6, p.602-608, nov. 2016. Elsevier BV.
- ROSS, Christopher A. et al. Huntington disease: natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. **Nature Reviews Neurology**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.204-216, 11 mar. 2014. Springer Nature.
- ROUET, P.; SMIH, F.; JASIN, M.. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 14, p. 8096–8106, 1994. Bimensal.
- RUDIN, N.; SUGARMAN, E.; HABER, J. E.. Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, Bethesda, v. 122, p. 519–534, 1989.
- RYDER, S et al. The Burden, Epidemiology, Costs and Treatment for Duchenne Muscular Dystrophy: An Evidence Review. **Orphanet J Rare Dis**. v.12, 2017.
- SAAYMAN, Sheena et al. The therapeutic application of CRISPR/Cas9 technologies for HIV. **Expert Opinion On Biological Therapy**, [s.l.], v. 15, n. 6, p.819-830, 12 abr. 2015. Informa Healthcare.
- SANDOR Z.; BREDBERG A.. Deficient DNA repair of triple helixdirected double psoralen damage in human cells, **FEBS Lett**, v. 374, p. 287–291, 1995.
- SAVIC, Natasa; SCHWANK, Gerald. Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. **Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Amsterdã, v. 168, p.15-21, set. 2015.
- SCHUMANN, K. et al. Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. **PNAS**, 2017.
- SEEGER, Christoph; A SOHN, Ji. Targeting Hepatitis B Virus With CRISPR/Cas9. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [s.l.], v. 3, p.216-220, jan. 2014. Elsevier BV.
- SILVA, Roberto Jose Carvalho da et al. HPV-related external genital lesions among men residing in Brazil. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], p.342-350, abr. 2017. Elsevier BV.

SONTHEIMER, Erik J.; BARRANGOU, Rodolphe. The Bacterial Origins of the CRISPR Genome Editing Revolution. **Human Gene Therapy**, New Rochelle, v. 26, n. 7, p.413-424, jul. 2015.

SUENAGA, Tadahiro et al. Engineering large viral DNA genomes using the CRISPR-Cas9 system. **Microbiology And Immunology**, [s.l.], v. 58, n. 9, p.513-522, set. 2014. Wiley-Blackwell.

SULLIVAN, Lori S. et al. A Dominant Mutation in Hexokinase 1 (HK1) Causes Retinitis Pigmentosa. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, [s.l.], v. 55, n. 11, p.7147-7159, 7 nov. 2014. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO).

SUN, Yongwei et al. Engineering Herbicide-Resistant Rice Plants through CRISPR/Cas9-Mediated Homologous Recombination of Acetolactate Synthase. **Molecular Plant**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.628-631, abr. 2016. Elsevier BV.

TAKESHITA, Eri et al. Duchenne muscular dystrophy in a female with compound heterozygous contiguous exon deletions. **Neuromuscular Disorders**, [s.l.], p.234-240, abr. 2017. Elsevier BV.

TURNER, Elizabeth M. et al. The Torsin Activator LULL1 Is Required for Efficient Growth of Herpes Simplex Virus 1. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 89, n. 16, p.8444-8452, 3 jun. 2015. American Society for Microbiology.

UNIVERSITÉ D'ANGERS. **Les systèmes CRISPR - Cas ("Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - CRISPR-associated")**. 2017. Disponível em: <<http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/Zsuite/6BiochMetabSUITE/4CRISPR/1CRISPR.htm>>.

WANG, D et al. Adenovirus-Mediated Somatic Genome Editing of Pten by CRISPR/Cas9 in Mouse Liver in Spite of Cas9-Specific Immune Responses. **Human Gene Therapy**.v.26 n.1 p.432-442, 2015a.

WANG, Gang et al. A Combinatorial CRISPR-Cas9 Attack on HIV-1 DNA Extinguishes All Infectious Provirus in Infected T Cell Cultures. **Cell Reports**, [s.l.], v. 17, n. 11, p.2819-2826, dez. 2016a. Elsevier BV.

WANG, Gang et al. CRISPR-Cas9 Can Inhibit HIV-1 Replication but NHEJ Repair Facilitates Virus Escape. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.522-526, mar. 2016b. Elsevier BV.

WANG, Jie. Dual gRNAs guided CRISPR/Cas9 system inhibits hepatitis B virus replication. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 21, n. 32, p.9554-9560, 2015b. Baishideng Publishing Group Inc.

WANG, Zhen et al. CRISPR/Cas9-Derived Mutations Both Inhibit HIV-1 Replication and Accelerate Viral Escape. **Cell Reports**, Cambridge, v. 15, p.1-9, abr. 2016c.

WESTRA Edze R.; BUCKLING, Angus; FINERAN, Peter C.. CRISPR–Cas systems: beyond adaptive immunity. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v.12, p.317-326, 2014.

WOJTAL, Daria et al. Spell Checking Nature: Versatility of CRISPR/Cas9 for Developing Treatments for Inherited Disorders. **The American Journal Of Human Genetics**, [s.l.], v. 98, n. 1, p.90-101, jan. 2016. Elsevier BV.

XIE, Kabin; YANG, Yinong. RNA-Guided Genome Editing in Plants Using a CRISPR–Cas System. **Molecular Plant**, [s.l.], v. 6, n. 6, p.1975-1983, nov. 2013. Elsevier BV.

XU, Xiaohong et al. Reversal of Phenotypic Abnormalities by CRISPR/Cas9-Mediated Gene Correction in Huntington Disease Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. **Stem Cell Reports**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.619-633, mar. 2017. Elsevier BV.

YDER, S. et al. The burden, epidemiology, costs and treatment for Duchenne muscular dystrophy: an evidence review. **Orphanet Journal Of Rare Diseases**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.344-352, 26 abr. 2017. Springer Nature.

YIM, Eun-kyoung; PARK, Jong-sup. The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. **Cancer Research And Treatment**, [s.l.], v. 37, n. 6, p.319-324, 2005. Korean Cancer Association.

YIN, Chaoran et al. In Vivo Excision of HIV-1 Provirus by saCas9 and Multiplex Single-Guide RNAs in Animal Models. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 25, n. 5, p.1168-1186, maio 2017. Elsevier BV.

ZAMPINO, Rosa. Hepatitis B virus burden in developing countries. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 21, n. 42, p.11941-11955, 2015. Baishideng Publishing Group Inc.

ZHANG, Yu et al. CRISPR-Cpf1 correction of muscular dystrophy mutations in human cardiomyocytes and mice. **Science Advances**, [s.l.], v. 3, n. 4, p.133-138, abr. 2017. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

ZHEN, Shuai 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**, [s.l.], v. 450, n. 4, p.1422-1426, ago. 2014. Elsevier BV.

ZHENG, Andrew; LI, Yao; TSANG, Stephen H. Personalized therapeutic strategies for patients with retinitis pigmentosa. **Expert Opinion On Biological Therapy**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.391-402, 23 jan. 2015. Informa Healthcare.

ZHU, Jie et al. Gene and mutation independent therapy via CRISPR-Cas9 mediated cellular reprogramming in rod photoreceptors. **Cell Research**, [s.l.], p.321-329, 21 abr. 2017. Springer Nature.