

Eu, António David Rufino Ramos, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011143606, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do relatório da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 5 de Julho 2016

(António David Rufino Ramos)



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

*“If I had asked people what they wanted,
They would have said faster horses.”*

(Henry Ford)

Um agradecimento especial...

Aos meus pais, que me deram a possibilidade de poder tirar este curso.

Aos meus amigos, pelo companheirismo vivido e pelas conquistas alcançadas.

Ao Professor Doutor Luís Almeida, pela enorme disponibilidade prestada.

Aos Funcionários da Faculdade de Farmácia, pelos cinco anos de auxílio.

À Phartuna, por todos os momentos vividos.

Resumo

Os crescentes avanços na área da terapia génica têm revolucionado a maneira de pensar sobre tudo o que nos rodeia, particularmente na área da saúde. O sistema CRISPR/Cas9 (*clustered regularly short palindromic repeats-CRISPR associated nucleases*) tem-se destacado devido à sua versatilidade e simplicidade de manuseamento em laboratório. O seu potencial terapêutico tem aumentado com o conhecimento cada vez mais pormenorizado dos seus mecanismos de atuação e das diferentes estratégias de modificação usadas para melhorar a especificidade e eficiência.

Neste trabalho são apresentados os mais recentes avanços na tecnologia CRISPR/Cas9 que a aproximam da sua aplicação na resolução de doenças genéticas e epigenéticas.

Palavras-chave: CRISPR/Cas9; gRNA; ferramenta; doença; iPSCs, edição génica, *off-target*, entrega

Abstract

Increasing advances in gene therapy have revolutionized the way we think about everything around us, particularly in healthcare. The CRISPR/Cas9 system (Clustered Regularly Short Palindromic Repeats-CRISPR associated nuclease 9) has been highlighted due to its versatility and simplicity to be handled in the laboratory. The therapeutic potential of this gene editing technology has increased with the progressively detailed knowledge of its mechanisms of action and different strategies used in order to raise its specificity and efficiency.

This dissertation presents the latest advances in CRISPR/Cas9 technology, which are suggestive of its application as a tool for the resolution of genetic and epigenetic diseases.

Keywords: CRISPR/Cas9; gRNA; tool; disease; iPSCs, gene editing, off-target, delivery

Índice

Resumo.....	0
Abstract.....	0
Índice.....	1
Abreviaturas e Acrónimos.....	2
Nota Introdutória.....	4
1- Nucleases: ferramentas de edição genética.....	5
2- Funcionamento do sistema CRISPR/Cas9.....	6
3- Como transportar o sistema CRISPR/Cas9 até às células alvo.....	11
4-Uma abordagem <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i>	13
5- Tratamento de patologias com recurso à CRISPR/Cas9.....	17
6- CRISPR/Cas9 da Bancada do Laboratório à Clínica.....	23
7- Considerações Finais.....	24
Bibliografia.....	25

Abreviaturas e Acrónimos

- AAVs** - Vírus adeno-associados
- Cas9** - Caspase 9
- CCR5** - *chemokine receptor 5*
- CFTR** - *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*
- CRISPR** - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
- CrygC** - *Gene Crystallin Gama C*
- dCas9** - *dead Cas9*
- DMD** - Distrofia Muscular de Duchenne
- DNA** - Ácido Desoxirribonucleico
- DNMT** - Ácido Desoxirribonucleico Metiltransferase
- DSB** - Clivagem da dupla cadeia
- EGFR** - *Epidermal Growth Factor Receptor*
- FAH** - Hidrolase Fumarilacetoacetato
- FMRI** - *Gene fragile X mental retardation*
- gRNA** - RNA guia
- HDAC** - Histona Desacetilase
- HDR** - Mecanismo de Reparação Homóloga
- iPSCs** - Células Estaminais Pluripotentes Induzidas
- KRAB** - *Repressor Kruppel-associated box*
- LTR** - *Long Terminal Repeats*
- mRNA** - RNA mensageiro
- miRNA** - micro RNA
- NHEJ** - Mecanismo de Reparação não Homólogo
- NSCLC** - *Non-Small Cell Lung Cancer*
- PAM** - *Protospacer Adjacent Motif*
- PCSK9** - *Proprotein convertase subtilisin/ kexin type 9*
- RBPs** - *Proteínas ligantes do RNA*
- RNA** - ácido ribonucleico
- RNase** - *Host Factor Ribonuclease*
- RNP** - Ribonucleoproteínas
- sgRNA** - *single guide RNA*
- TALENs** - *transcription activator-like effectores*

TK - Tirosina Cinase

tracrRNA - *trans-activating CRISPR RNA*

ZFNs - *Zinc Finger Nuclease*

Nota Introdutória

As bactérias são frequentemente expostas a condições de stress, como infeções por bacteriófagos e outros elementos genéticos. Estes eventos podem originar a transferência horizontal de genes, mediada por transdução, transformação ou conjugação com elementos móveis, como os plasmídeos (KOONIN e WOLF, 2008; RICHTER *et al.*, 2012).

O material genético recebido do exterior poderá conferir à bactéria mecanismos de imunidade adaptativa (MARRAFFINI e SONTHEIMER, 2011), fruto da integração de pequenas porções do material genético externo em regiões de sequências repetitivas da bactéria designadas por CRISPR, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (RICHTER *et al.*, 2012).

As CRISPR podem ser traduzidas em pequenos fragmentos de RNA que se associam a proteínas específicas as *CRISPR associated proteins* ou Cas formando um complexo capaz de degradar o material genético invasor (HSU *et al.*, 2014; RICHTER *et al.*, 2012). A degradação ocorre caso a porção de material genético invasor já tenha contactado com a bactéria e integrado o seu genoma, estando presente na forma de RNA no complexo CRISPR/Cas que agora irá destruir a nova invasão (SANDER e JOUNG, 2014).

Apesar de apresentarem semelhanças mecánísticas existe uma grande variedade nos sistemas CRISPR/Cas, encontrados em diferentes bactérias. O sistema CRISPR/Cas tipo II proveniente da bactéria *Streptococcus pyogenes* é o mais estudado devido à sua menor complexidade mecánística e mais fácil aplicabilidade em terapia génica (DOUDNA e CHARPENTIER, 2014; JINEK *et al.*, 2012).

As propriedades deste sistema têm vindo a ser exploradas e testadas por diversos grupos de investigação dedicados à área da terapia génica.

Este trabalho aborda os principais mecanismos e particularidades do sistema CRISPR/Cas9 que o tornam numa promissora ferramenta de edição génica, abordando exemplos de patologias genéticas em que a ferramenta tem vindo a ser estudada e os desafios a serem ultrapassados para que no futuro possa vir a ser testado na clínica, tal como feito para outros sistemas semelhantes.

I- Nucleases: ferramentas de edição genética

A edição genética através de cortes em locais específicos do DNA veio demonstrar todo o potencial das nucleases, enzimas capazes de quebrar as ligações existentes entre bases nucleotídicas. Existem 4 grandes grupos de proteínas que ligam ao DNA utilizadas em edição genética: as meganucleases provenientes de elementos genéticos móveis microbianos, as nucleases baseadas nos fatores de transcrição eucariotas como *zinc fingers* (ZFN), as *transcription activator-like effectores* (TALENs), provenientes da bactéria *Xanthomonas* e mais recentemente a endonuclease Cas9 do sistema imunitário adaptativo de algumas bactérias como *S. pyogenes* (HSU *et al*, 2014).

As proteínas meganucleases, ZFN e TALENs reconhecem locais específicos na sequência de DNA através de interações proteína-DNA. As meganucleases reconhecem sequências relativamente grandes de DNA e não foram extensamente adotadas na engenharia genética devido à falta de especificidade entre a proteína e o DNA alvo (SANDER e JOUNG, 2014). As ZFNs e as TALENs possuem módulos que reconhecem 3 e 1 nucleótidos, respetivamente, pelo que podem ser direcionadas para locais específicos no DNA através de alterações nos módulos e nas suas combinações. Contudo, as ZFNs e TALENs exibem uma ligação ao DNA dependente da conformação criada entre os vários domínios ZF adjacentes e o mesmo sucede com os monómeros TALE, o que exige laboriosos processos de mapeamento e enormes investimentos laboratoriais, (HSU *et al*, 2014), constituindo uma limitação ao seu uso. A grande diferença entre a Cas9 e as restantes é o facto do reconhecimento feito entre RNA e DNA, ter por base a complementaridade de bases (ligações Watson e Crick). A nuclease Cas9 é direcionada por uma pequena sequência de RNA que reconhece o DNA alvo por complementaridade tornando-o acessível à ação da Cas9, o que possui inúmeras vantagens comparativamente às nucleases anteriores (MAGGIO e GONÇALVES, 2015).

Primeiramente, na tecnologia CRISPR/Cas9 diversos locais genéticos alvo podem ser direcionados em simultâneo recorrendo a múltiplas sequências guia de RNA (gRNA) (CONG *et al.*, 2013; MALI *et al*, 2013). Todo o redireccionamento das nucleases ZFNs e TALENs requer processos laboratoriais de desenho e ressíntese de proteínas que possam guiar as nucleases para o local pretendido, enquanto o redireccionamento da nuclease Cas9 depende de duas sequências de RNA, o que é bastante mais fácil e simples (XUE *et al.*, 2015).

2- Funcionamento do sistema CRISPR/Cas9

O sistema CRISPR/Cas9 do tipo II é um mecanismo de defesa das bactérias e Archaea contra elementos genéticos invasores como fagos e plasmídeos de DNA. A memória imunitária surge após o DNA ser cortado em pequenos fragmentos e incorporado no CRISPR *locus*, passando a designar-se por protoespaçador. (DOUDNA e CHARPENTIER, 2014). O *locus* é transcrito numa cadeia precursora de RNA não codificante (pre-crRNA), As cadeias repetidas do pre-crRNA sofrem hibridação com um segundo RNA não codificante, o *trans-activating CRISPR RNA* (tracrRNA), formando uma cadeia dupla de RNA que é clivada e processada pela *host factor ribonuclease* (RNase) III. A forma duplex de crRNA-tracrRNA associa-se com a nucleasa Cas9 e forma um complexo responsável pelo reconhecimento e destruição do DNA invasor *in vitro* (CONG *et al.*, 2013; MALI *et al.*, 2013) e nas células procariotas (GRISSA *et al.*, 2007; BARRANGOU E MARRAFFINI, 2015). Esta estrutura formada, que possui o crRNA com o espaçador, tem especificidade para uma sequência alvo, ligando-se por complementaridade e arrastando consigo a nucleasa Cas9. O seu domínio HNH cliva a cadeia complementar e o domínio RuvC a cadeia não complementar, provocando um duplo corte na dupla cadeia de DNA (RICHTER *et al.*, 2012)(Figura 1). Tal só acontece caso a sequência alvo se encontre na região adjacente a uma pequena sequência conhecida como *protospacer adjacent motif* (PAM) (SANDER e JOUNG, 2014).

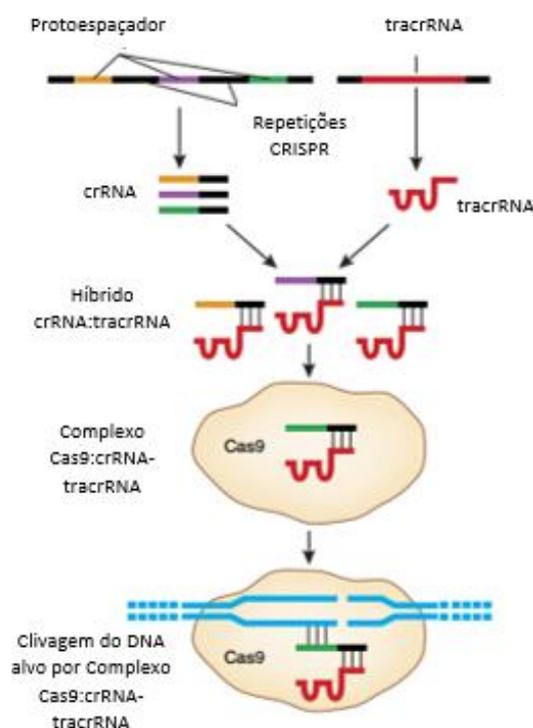


Figura 1 O crRNA derivado do protoespaçador hibridiza com o tracrRNA. O híbrido formado complexa com a Cas9, dirigindo-se até ao DNA alvo onde a região referente ao protoespaçador se liga por complementaridade, permitindo a clivagem pela Cas9. Adaptado de SANDER e JOUNG, 2014.(Sander e

2.1 Estrutura da Cas9

Estruturalmente a Cas9 contém 2 domínios enzimáticos independentes o HNH e o RuvC, cujos nomes derivam da homologia com as endonucleases correspondentes. Cada domínio é responsável pela clivagem de uma cadeia de DNA (JINEK *et al.*, 2012). O domínio HNH, estruturalmente mais simples, cliva a cadeia complementar de DNA, enquanto que o domínio RuvC, estruturalmente mais complexo, cliva a cadeia não complementar de DNA (HSU *et al.*, 2014; SHUI *et al.*, 2016). Recentemente, uma análise estrutural do complexo CRISPR/Cas9 permitiu verificar a existência de dois lóbulos com diferentes funções, sendo um de reconhecimento (REC) e um de nuclease (NUC). No REC a Cas9 interage com o RNA-DNA de várias formas, dependendo da conformação adquirida, o que permite inferir que a nuclease Cas9 não possui nenhuma especificidade no direcionamento pelo que é crucial a presença do crRNA-tracrRNA para poder exercer a sua atividade (JINEK *et al.*, 2014; NISHIMASU *et al.*, 2015). No entanto, mesmo possuindo a forma duplex crRNA-tracrRNA o processo de clivagem pela Cas9 não é totalmente específico, podendo ocorrer clivagens *off-target* (CONG *et al.*, 2013; RAN *et al.*, 2014).

2.2 Single Guide RNA (sgRNA)

De modo a facilitar todo o processo laboratorial foi desenvolvida por engenharia genética uma forma híbrida do duplex crRNA-tracrRNA, o *single guide RNA* (sgRNA), combinando as características essenciais do crRNA e tracrRNA que permitem a ligação por complementaridade ao DNA alvo e à Cas9, respectivamente (JINEK *et al.*, 2012; MALI *et al.*, 2013). Ao modificarmos apenas os 20 nucleótidos do terminal 5' do sgRNA que correspondem à região do protoespaçador do crRNA, modificamos a sequência que se liga ao DNA por complementaridade, pelo que modificamos o nosso alvo. Portanto, existe uma maior facilidade técnica em programar a Cas9 para qualquer sequência de DNA que possua o PAM numa zona adjacente (HSU *et al.*, 2014; JINEK *et al.*, 2012; Mali *et al.*, 2013).

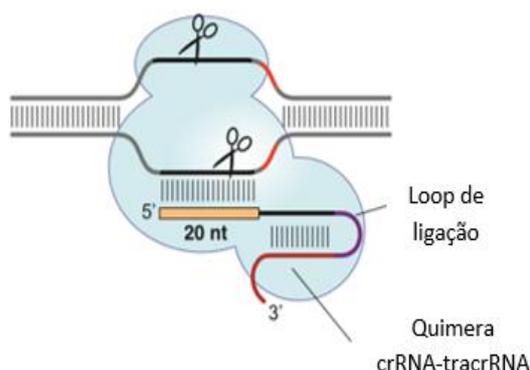


Figura 2 Regulação da Cas9 por uma única cadeia de RNA, fruto da fusão do terminal 3' crRNA com o 5' tracrRNA. Adaptado de JINEK *et al.*, 2012.

O *protospacer adjacent motif* (PAM) é uma sequência nucleotídica existente no DNA alvo, cuja presença é essencial para o desenrolamento do alvo pela Cas9. Na ausência da sequência PAM, o DNA alvo não é reconhecido pela Cas9 mesmo que a sequência de nucleótidos do sgRNA seja totalmente complementar (DOUDNA e CHARPENTIER, 2014; JINEK *et al.*, 2014). É através das interações existentes entre um domínio específico da Cas9 e a PAM que imediatamente a seguir a esta sequência resulta a separação da dupla cadeia de DNA, permitindo a posterior clivagem. Diferentes sistemas CRISPR requerem diferentes PAMs ao mesmo tempo que a Cas9 de diferentes espécies também tem diferentes preferências (SHUI *et al.*, 2016). Se por um lado existem inúmeras sequências PAM, por outro existem também várias nucleases que podem interagir com mais que uma destas sequências embora com afinidades diferentes (HSU *et al.*, 2014). A Cas9 tem versatilidade em reconhecer várias PAM, no entanto com níveis de eficiência diferentes. Se por um lado esta versatilidade das Cas9 pode ser explorada pela engenharia genética, por outro pode originar efeitos *off-target* no restante genoma (STERNBERG *et al.*, 2014).

A ligação do sgRNA por complementaridade e a presença da PAM na cadeia oposta permite a dupla clivagem da cadeia de DNA (*double-strand break* - DSB) pela Cas9. (XUE *et al.*, 2015).

2.3 Mecanismos de reparação do DNA

A DSB será processada por 2 mecanismos de reparação de DNA: a recombinação homóloga (HDR) e a recombinação não homóloga (NHEJ). De um modo geral a recombinação não homóloga (NHEJ) é mais ativa que a homóloga (HDR), devido a não necessitar de nenhum molde de DNA sendo o mecanismo usado preferencialmente durante a fase S e G2 do ciclo celular (HEYER *et al.*, 2010; XUE *et al.*, 2015). Contudo, é mais propensa a erros através de pequenas inserções ou deleções genéticas. Estas mutações *frameshift* podem levar a alteração da função do gene alvo. Já a recombinação homóloga (HDR) é mais precisa uma vez que necessita da presença de uma sequência molde sintética corretiva para proceder à reparação, diminuindo o erro. (BIBIKOVA *et al.*, 2002; HEYER *et al.*, 2010; SAVIC e SCHWANK, 2015) (Figura 3).

Estes tipos de mecanismos de reparação de DNA estão na base dos processos de edição genética dependente de nucleases programáveis.

2.4 Nickases Cas9

Caso um dos dois domínios (HNH e RuvC) da nuclease Cas9 seja inativado através de pequenas mutações pontuais são produzidas variantes da Cas9 com apenas um domínio catalítico, chamadas *nickases*. As *nickases* demonstram ser úteis em engenharia genética uma vez que catalisam apenas um corte na dupla cadeia de DNA.

Para aumentar a especificidade da DSB no alvo, desenvolveu-se um complexo com duas *nickases*, seguindo a analogia dos dímeros ZFN e TALEN e aumentando desta forma o número de bases reconhecidas. Este complexo mimetiza o duplo corte de DNA feito por uma só nuclease, aumentando a eficiência e correção na reparação. Por outro lado, qualquer clivagem *off-target* é reparada de forma precisa, o que torna este complexo de *nickases* uma estratégia promissora para aumentar a especificidade da Cas9 (HSU *et al*, 2014).

Caso os dois domínios enzimáticos da Cas9 sejam inativados esta fica cataliticamente morta, *dead Cas9* (dCas9), e ao ligar-se ao DNA pode reprimir a transcrição por impedimento estereoquímico da RNA polimerase (HSU *et al*, 2014; RAN *et al.*, 2014). Por outro lado, quando fundida com modificadores epigenéticos como VP64 ou KRAB (GILBERT *et al*, 2014; XUE *et al*, 2015) pode regular a ativação ou supressão da expressão do gene alvo, respetivamente. Contudo, a magnitude desta regulação exercida no gene alvo é normalmente baixa e varia bastante consoante o sgRNA (GILBERT *et al*, 2014; KONERMANN *et al*, 2015). Uma expressão mais robusta na regulação da expressão genética pode ser encontrada direcionando múltiplos sgRNA para múltiplos alvos no mesmo gene (XUE *et al*, 2015). No entanto, nos estudos de screening é preferida a regulação por apenas poucos sgRNAs, por uma questão de tamanho das bibliotecas de sgRNA.

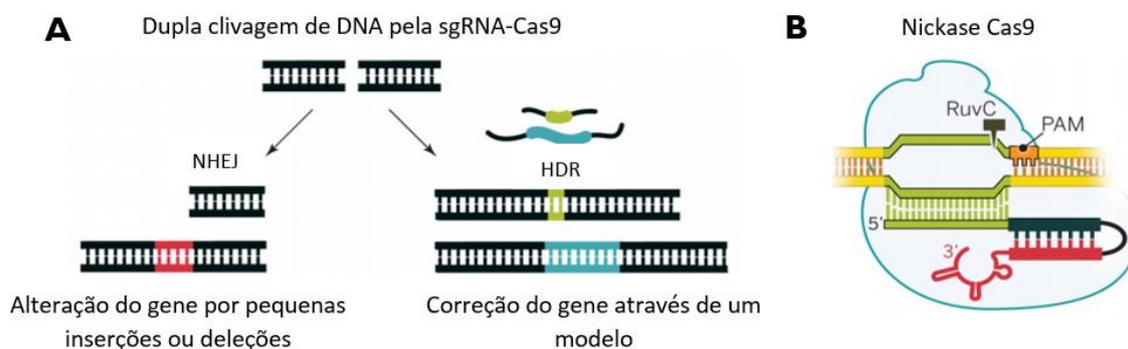


Figura 3 **A)** Mecanismos de reparação homóloga (HDR) e não homóloga (NHEJ) após dupla clivagem por sgRNA-cas9. **B)** Nickase Cas9 com o domínio RuvC ativo e o domínio HNH inativo cataliticamente. Adaptado de DOUDNA E CHARPENTIER, 2014.

Uma estratégia usada de forma a aumentar a potência de regulação de um único sgRNA consiste em incorporar uma porção de RNA capaz do recrutamento de *RNA-binding proteins* (RBPs), responsáveis pela captação dos modificadores epigenéticos e regulação epigenética no gene alvo. Efeitos sinérgicos podem ser conseguidos usando uma estratégia combinada entre o sgRNA modificado e o complexo dCas9 fundido aos modificadores epigenéticos (KONERMANN *et al*, 2015; XUE *et al*, 2015).

2.5 Efeitos *off-target*

Todo o sistema CRISPR/Cas9 tem sofrido grandes desenvolvimentos no sentido de aumentar a especificidade e eficiência para a sequência alvo, com o objetivo de diminuir os efeitos *off-target* (XUE *et al*, 2015).

A região de 18-20 nucleótidos correspondente ao protoespaçador no gRNA é responsável por uma grande parte dos efeitos *off-target* e *on-target*. Na teoria uma única sequência nucleotídica deveria corresponder a uma única sequência alvo que tivesse uma região PAM adjacente característica, contudo constatou-se que existe mais do que uma sequência PAM que pode ativar a mesma nuclease, embora com afinidades diferentes (ANDERS *et al*, 2014; SHUI *et al*, 2016). No caso da Cas9 proveniente da bactéria *S. pyogenes*, a sequência “NGG” é reconhecida como a sequência ótima, no entanto uma sequência “NAG” pode também ser reconhecida pela mesma enzima, embora com menor frequência. Têm sido feitos progressos no sentido de desenvolvimento de locais de reconhecimento cada vez mais rígidos de forma a otimizar a especificidade da nuclease para uma determinada região PAM (Shui *et al*, 2016).

A comunidade científica tem vindo a perceber que é muito frequente a ligação entre o protoespaçador e o DNA alvo tolerar nucleótidos não complementares, o que permite à Cas9 exercer o seu efeito de nuclease, embora a sequência reconhecida não seja a desejada. Tal facto sugere que uma sequência específica no gRNA não consegue por si só garantir especificidade e que são necessários mais desenvolvimentos no conhecimento da enzimologia da Cas9 para contornar este problema. No entanto, continua a ser desenvolvida uma biblioteca de sgRNAs com o objetivo de apurar qual a melhor sequência para um alvo específico.

Algumas regras têm sido seguidas para a criação destes gRNAs. Por exemplo a existência de um nucleótido de guanina numa posição mais próxima da PAM facilita o reconhecimento por parte da Cas9; por outro lado, nucleótidos de timina assumem uma posição desfavorável perto da região PAM, uma vez que a RNA polimerase III reconhece os

nucleótidos de uracilo no gRNA como um sinal de término, o que leva a uma menor expressão de gRNA. Nucleótidos de citosina são preferidos no local de clivagem de DNA. Os gRNA espaçadores ricos em nucleótidos guanina são mais estáveis comparativamente a espaçadores ricos em nucleótidos adenina, por conseguinte a estabilidade de gRNA será maior, estando diretamente relacionada com o aumento da atividade do sistema CRISPR/Cas9 (HILL *et al.*, 2015). Todo o desenho racional envolvido na construção destes gRNA é ajudado por programas bioinformáticos desenvolvidos no sentido de facilitar e direcionar para um alvo específico.

Pensa-se que uma diminuição da concentração da proteína Cas9 e de gRNA, poderá estar associada com a diminuição dos efeitos *off-target*. Outros fatores como a acessibilidade da cromatina no local alvo e a capacidade de resposta celular às lesões induzidas pela CRISPR são igualmente determinantes no sucesso do sistema CRISPR/Cas9 (SHUI *et al.*, 2016; STERNBERG *et al.*, 2014).

Outra proposta para aumentar a especificidade é o desenvolvimento de complexos duplos de *nickases*, em que a atividade de uma dependa estritamente da atividade de outra, aumentando a especificidade do reconhecimento (SANDER e JOUNG, 2014).

Todos estes desenvolvimentos podem ser combinados e desenvolvidos no sentido de otimizar cada vez mais o sistema CRISPR/Cas9.

3- Como transportar o sistema CRISPR/Cas9 até às células alvo

O transporte do sistema CRISPR/Cas9 para as células continua a ser um desafio constante para a engenharia genética, sendo necessários métodos mais eficientes e seletivos que forneçam a oportunidade de introduzir as ferramentas de edição apenas nas células e tecidos pretendidos. Apesar de todas as limitações existentes destacem-se três potentes métodos de transporte da Cas9 e gRNA até às células alvo (JINEK *et al.*, 2013; KHAN *et al.*, 2016).

3.1 Plasmídeos

Os plasmídeos constituem o método mais popular para o transporte do sistema CRISPR/Cas9 até às células alvo e têm como uma das principais vantagens a fácil produção *in vitro*. As células são transfetadas, simultaneamente, com plasmídeos que codifiquem a Cas9, crRNA e tracrRNA, por métodos de eletroporação (JINEK *et al.*, 2013), no entanto a aplicabilidade deste procedimento a seres humanos será apenas em casos *ex vivo*. Tentativas

de simplificação deste método foram desenvolvidas, tendo sido criado um plasmídeo que codifica o sgRNA e mais recentemente um vetor que codifica no mesmo plasmídeo a Cas9 e o sgRNA, reduzindo de três para apenas um os plasmídeos a entregar. Esta tecnologia permite rearranjar os plasmídeos de forma a codificarem para múltiplos gRNA, permitindo múltiplas correções no *locus* (MALI *et al.*, 2013).

Estudos *in vivo* demonstram algumas limitações deste método devido ao silenciamento epigenético bem como à baixa eficiência de entrega (CHEN *et al.*, 2003). Verificou-se que numa proporção de células transfectadas houve integração aleatória do material genético no genoma do hospedeiro, o que por um lado permite uma contínua produção de Cas9 e gRNA, mas por outro leva a que possam ocorrer efeitos *off-target* e mutações por inserção. Caso esta característica não seja desejada o plasmídeo perde-se passado alguns ciclos celulares (KIM *et al.*, 2014; SHUI *et al.*, 2016).

3.2 Vetores Virais

Os vetores virais são amplamente usados como ferramenta de introdução de um fragmento de DNA exógeno em células primárias ou células refratárias à transfeção por plasmídeos (SHUI *et al.*, 2016).

Os lentivírus têm a capacidade de integrar um fragmento de DNA exógeno no material genético da célula alvo de forma aleatória, o que pode gerar inserções indesejadas no *locus* do hospedeiro. Tal facto constitui uma limitação ao uso deste tipo de vetores virais (ZHOU *et al.*, 2014).

De forma a contornar este problema recorre-se frequentemente a vetores virais não integrativos, como os adenovírus e os vírus adeno-associados (AAVs) (JINEK *et al.*, 2013), cujo DNA viral desaparece após alguns ciclos mitóticos (MAGGIO *et al.*, 2014). A sua natureza episomal, a grande capacidade de ser clonado e transduzido em inúmeras linhas celulares, bem com a facilidade de produção aumenta o potencial de utilização destes vetores. Estudos *in vitro* mostraram que os adenovírus têm uma boa correlação entre a eficiência de empacotamento e o tamanho do vírus, contudo quando usados *in vivo* podem induzir um aumento da resposta imunitária no hospedeiro, com aumento das citocinas inflamatórias e podendo levar à destruição das células (RAN *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015). Em contrapartida, os AAVs induzem uma resposta imunitária ligeira, podendo fornecer uma expressão duradoura em células não se encontrem em divisão. O pequeno tamanho deste tipo de vírus acarreta preocupações no empacotamento do gene da Cas9, todavia este problema poderá ser resolvido usando uma Cas9 proveniente da bactéria

Staphylococcus aureus que, embora mais pequena, demonstrou ter a mesma eficiência que a Cas9 da *S. pyogenes*, sem aumentar número de mutações *off-target*.

Resultados recentes sugerem que a escolha do vetor viral mais adequado recai no uso de vírus AAVs em que a Cas9 é proveniente da bactéria *S. aureus* em detrimento da *S. pyogenes*, comumente usada (RAN *et al.*, 2014).

3.3 Ribonucleoproteínas (RNPs)

O transporte e entrega de ribonucleoproteínas (RNP) às células alvo constitui um método alternativo aos plasmídeos e vetores virais. Tanto os plasmídeos como os vetores virais deparam-se com uma expressão prolongada de Cas9 e gRNA nas células enfrentando muitas vezes elevadas taxas de mutações *off-target*. A entrega direta de RNPs, com a Cas9 conjugada com gRNA, proporciona uma maneira efetiva de contornar este problema. Imediatamente após serem injetadas, as RNPs induzem a alteração específica no local alvo, numa percentagem muito mais elevada do que quando transfetadas por plasmídeos, degradando-se de seguida (HENDEL *et al.*, 2015; SHUI *et al.*, 2016). Adicionalmente, o uso de RNPs evita a possibilidade de integrações de DNA não desejadas.

Este complexo pode ser rapidamente produzido *in vitro*, o que o torna muito usado em múltiplas linhas celulares humanas (KIM *et al.*, 2014). As RNPs são tradicionalmente entregues por microinjeção direta, podendo também ser usada a técnica de eletroporação bem como lipossomas catiónicos (Zuris *et al.*, 2015). A entrega de RNPs numa cultura de células sincronizadas numa fase específica do ciclo celular permite aumentar a taxa de sucesso da técnica (SHUI *et al.*, 2016).

Pode-se recorrer também à construção de nanopartículas de carga positiva fruto da conjugação da Cas9, gRNA e proteínas de penetração celular que tenham a capacidade de entregar a Cas9 e gRNA no núcleo das células humanas alvo de forma eficiente, mantendo ao mesmo tempo a viabilidade celular (RAMAKRISHNA *et al.*, 2014).

4-Uma abordagem *in vivo* e *ex vivo*

A CRISPR/Cas9 é passível de ser utilizada em terapia génica, que pode ser *ex vivo* através da modificação de células humanas em cultura, sendo posteriormente transplantadas para o ser humano ou potencialmente *in vivo* mediante edição directa de células no organismo alvo (SAVIC e SCHWANK, 2015).

4.1 Edição genética *in vivo*

Um dos primeiros casos de sucesso em engenharia genética ocorreu no tratamento da tirosinemia tipo I, doença caracterizada pela deficiência da enzima *fumarylacetoacetate hydrolase* (FAH), que conduz à acumulação de um metabolito tóxico nos hepatócitos levando à morte destas células (YIN *et al.*, 2014). Foram injetados em modelos animais vetores que codificavam para a Cas9 e um sgRNA específico, bem como a porção de DNA para reparação homóloga, tendo-se verificado a correção do alelo mutante.

A *proprotein convertase subtilisin/ kexin type 9* (PCSK9) que funciona com um antagonista dos recetores LDL, podendo levar a valores de colesterol aumentados (DING *et al.*, 2014). O silenciamento da PCSK9 foi conseguido através do uso de vetores adenovirais (Figura 4) para transportar o sistema CRISPR/Cas9, que causou a desfuncionalização do gene por mecanismos de NHEJ. Alguns estudos em animais demonstraram que é possível erradicar o vírus da hepatite B, através da clivagem do DNA circular responsável pela replicação viral (SAVIC e SCHWANK, 2015).

4.2 Edição genética em embriões

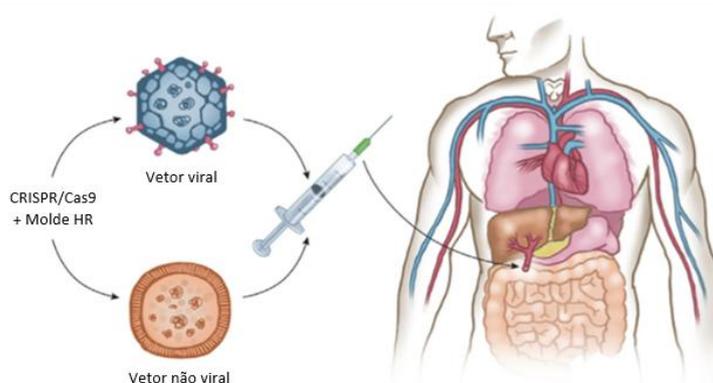


Figura 4 Edição genética *in vivo* através da entrega de vetores virais e não virais. Adaptado de SAVIC e SCHWANK, 2015.

A introdução dos componentes do CRISPR/Cas9 (Cas9, sgRNA e cadeia nucleotídica molde para HDR) num zigoto ou numa fase embrionária precoce permite modificar o genoma em todas as células do organismo, incluindo as da linha germinativa (WANG *et al.*, 2014). Este tipo de abordagem permite alterações permanentes que podem ser transmitidas às gerações seguintes, o que possibilita a eliminação de doenças genéticas hereditárias.

A perda de função do gene *Crystallin Gama C*, *CrygC*, está associada ao aparecimento de cataratas. A introdução no zigoto do mRNA da Cas9 e do sgRNA direcionado para o gene *CrygC*, conduziu à correção da mutação e reparação por HDR com base no alelo do cromossoma homólogo (WU *et al.*, 2013). A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é

causada por uma mutação no gene da distrofina que, através de edição génica, pode ser reparado. Recorreu-se à injeção do mRNA da Cas9, e um sgRNA específico e de uma única cadeia de DNA, a reparação deu-se por HDR a partir de um molde exógeno (LONG *et al.*, 2015). Apesar de terem sido feitos estudos recorrendo ao uso de zigotos humanos tripnucleares para corrigir patologias genéticas sanguíneas (XIE *et al.*, 2014), existem muito poucos estudos em embriões humanos pois é um tema controverso e delicado que levanta preocupações éticas na comunidade científica e no público em geral (SAVIC e SCHWANK, 2015).

4.3 Edição genética em células somáticas

A edição genética *ex vivo* requer protocolos rígidos para a cultura de células humanas para que depois de reprogramadas possam ser transplantadas de volta na mesma pessoa.

Hoje em dia, é possível desenvolver células estaminais induzidas (iPSCs) a partir de fibroblastos humanos (TAKAHASHI *et al.*, 2007). As iPSCs propagam-se infinitamente e podem ser diferenciadas em qualquer célula do corpo, o que representa um enorme potencial em terapia génica. Por outro lado, existem também protocolos bem estabelecidos, para reprogramação direta em células somáticas, o que permite ultrapassar passos de reprogramação celular exigidas para as iPSCs, diminuindo a ocorrência de mutações indesejadas (CSASZAR *et al.*, 2012; HUCH *et al.*, 2015) (Figura 5).

O sistema CRISPR/Cas9 foi usado em iPSCs para o tratamento de doenças hematológicas, como a β -talassémia (XIE *et al.*, 2014). Nestes casos *ex vivo* a eficiência da recombinação homóloga é identificada por um processo de seleção, através da integração de um gene de resistência a um antibiótico. Apenas as células contendo o gene de resistência, que eram as mesmas que efetuaram a recombinação homóloga, foram selecionadas (LI *et al.*, 2016). Após um processo de seleção as células em que ocorreu recombinação homóloga foram isoladas e, posteriormente diferenciadas em percursores funcionais das células sanguíneas, podendo ser usadas para transplantação (SAVIC e SCHWANK, 2015).

Mais recentemente, recorreu-se a células estaminais intestinais para corrigir o gene *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR, e cuja perda de função é responsável pelos sintomas da fibrose cística. Primeiramente foram isoladas as células estaminais de doentes com fibrose cística e expandidas em culturas tridimensionais. Estas foram posteriormente transfetadas com o complexo CRISPR/Cas9 direcionado para o gene CFTR e com um molde exógeno para a correção por HDR. Após sequenciação genética

conseguiu-se demonstrar uma elevada eficácia na correção do gene CFTR, bem como uma baixa percentagem de efeitos *off-target* (SCHWANK *et al.*, 2013) (Figura 5).

Um das grandes vantagens da terapia genética *ex vivo* é a de permitir selecionar e analisar as células antes da transplantação. Apenas os clones recombinantes que possuam a correção no alelo alvo e que não possuam mutações *off-target* serão escolhidos para transplantar de volta no doente. Devido ao processo de seleção, a eficiência e precisão do CRISPR/Cas9 é um passo menos crítico na abordagem *ex vivo* do que na *in vivo* (SAVIC e SCHWANK, 2015), embora a abordagem *ex vivo* nem sempre seja aplicável.

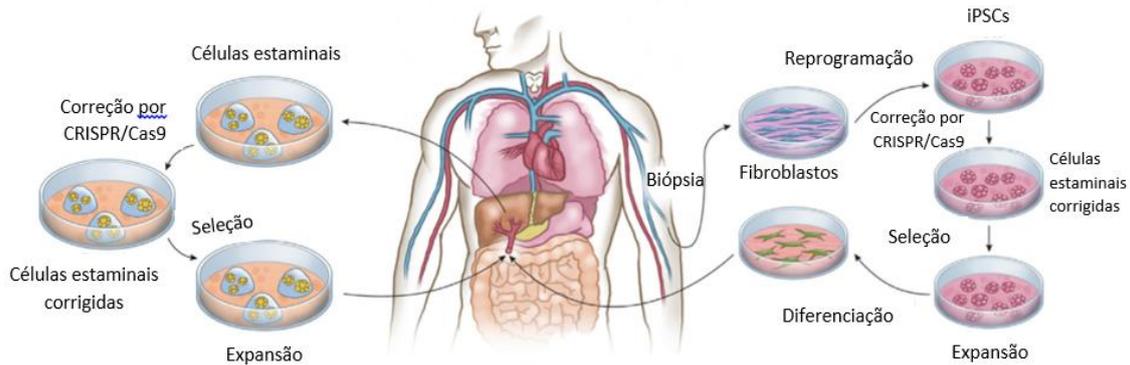


Figura 5 Edição genética *ex vivo*. Neste caso os genes são editados externamente em células somáticas ou iPSCs anteriormente reprogramadas, provenientes de um doente. Depois de corrigidas as células passam por um processo de seleção e expansão para posteriormente serem transplantadas no doente. Adaptado de SAVIC e SCHWANK, 2015.

5- Tratamento de patologias com recurso à CRISPR/Cas9

5.1- Doenças sanguíneas: β -Talassemia

Recentemente tem-se vindo a demonstrar-se que a tecnologia CRISPR/Cas9 tem um enorme potencial no tratamento de doenças hematológicas (Tabela I) que visem a correção de um determinado gene alvo.

Patologia	Alvo da CRISPR/Cas9	Mecanismo de reparação
β -Talassemia	Gene da Hemoglobina Beta	HDR em iPSCs
Hemofilia A	Gene do Factor de coagulação VIII	Reversão de inversões cromossomais em iPSCs
Anemia de Fanconi	Gene FANCC	HDR em iPSCs
Doença granulomatosa crónica	Gene CYBB	HDR em iPSCs

Tabela I Doenças sanguíneas alvo da CRISPR/Cas9. iPSCs (*induced pluripotent stem cell*); HDR (*Homology Directed Repair*); FANCC (*Fanconi Anemia Complementation C*); CYBB (*Cytochrome b subunit beta*).

A β -talassemia é causada por uma mutação ao nível do gene que codifica a hemoglobina Beta, reduzindo a sua produção e causando anemia. Atualmente a única cura para esta patologia é através da transplantação de células estaminais de um dador saudável.

Com uma nova técnica através do uso de zigotos humanos tripnucleares foi possível corrigir o gene que codifica para a Hemoglobina Beta (LIANG *et al.*, 2015). Se por um lado o uso de embriões humanos para a edição génica ainda não é consensual na comunidade científica (CYRANOSKI, 2015), por outro existem algumas modificações *off-target* que comprometem a especificidade da técnica.

Foram desenvolvidos esforços no sentido de utilizar iPSCs produzidas a partir de fibroblastos de um doente homocigótico para a β -talassemia e posteriormente transfetá-los com vetores contendo o sistema CRISPR/Cas9 direcionado para o alelo alvo e uma porção de DNA molde para recombinação homóloga. As células que efetivamente passaram o processo de recombinação homóloga foram selecionadas de entre as outras, tendo sido posteriormente diferenciadas em células precursoras dos glóbulos vermelhos. No futuro estas poderão ser usadas em transplantação (XIE *et al.*, 2014).

5.2- Doenças virais: Vírus da Imunodeficiência Humana

Para além do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) existem muitas doenças virais que atuam no genoma humano, para as quais o CRISPR/Cas9 pode ser usado como ferramenta de combate (Tabela 2).

Infeção viral	Alvo da CRISPR/Cas9	Mecanismo de ação
Vírus da Imunodeficiência Humana	Gene CCR5 Região LTR	Ablação do CCR5 Destruição dos LTR
Vírus da Hepatite B	cDNA	Destruição do cDNA intra-hepático
Vírus do Papiloma Humano	Gene E6 e E7	Destruição das proteínas E6 e E7 e aumento de supressores tumorais
Vírus Epstein-Barr	Gene EBNA 1 e EBNA 3C	Destruição e silenciamento dos genes

Tabela 2 Doenças virais alvo da CRISPR/Cas9. CCR5 (*chemokine receptor 5*); LTRs (*Long Terminal Repeats*); cDNA (*circular DNA*); EBNA (*Epstein-Barr nuclear antigen*).

Têm sido feitos estudos *ex vivo* na tentativa de combater a infeção mediada pelo vírus HIV, que se integra no genoma do hospedeiro para sempre. A fase de latência do vírus ocorre nos linfócitos T de memória, permanecendo mesmo na presença de potentes fármacos antirretrovirais.

Uma das estratégias para combater a infeção latente passa por direcionar as nucleases, como a Cas9, para a porção de DNA alvo que está integrado no genoma dos linfócitos T infetados. Um dos estudos realizados direcionou o complexo CRISPR/Cas9 para a região dos *Long Terminal Repeats* (LTR) do genoma do vírus, região que é altamente conservada, nos linfócitos T CD4 (LIAO *et al.*, 2015). A destruição da região LTR mediada pela Cas9 resulta numa diminuição da carga viral acompanhada da eliminação do vírus latente. Para além disso foi demonstrado que iPSCs que foram transduzidas com vetores contendo CRISPR/Cas9 contra a região LTR e posteriormente diferenciadas em linfócitos T mostraram-se resistentes a uma nova infeção pelo HIV.

Foi usada outra estratégia através da modulação do *receptor das quimiocinas 5* (CCR5) que é necessário à infeção das células T. A desfuncionalização do CCR5 através de uma estratégia baseada na Cas9, em células da linhagem hematopoética mostrou uma eficiência de cerca de 30%. Após xenotransplantação em ratinhos verificou-se o potencial de diferenciação celular bem como o reduzido número de efeitos *off-target* (MANDAL *et al.*, 2015). Este estudo é apoiado pelo sucesso dos ensaios clínicos já existentes com ZFN contra o gene CCR5 no controlo do HIV (TEBAS *et al.*, 2014).

5.3-Doenças cancerígenas: Cancro do Pulmão

O cancro é causado por uma série de alterações genéticas e epigenéticas que resultam na ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores tumorais (KHAN *et al.*, 2016). Em muitos cancros o uso de apenas um fármaco é ineficaz pelo que a terapia combinada mostra-se a alternativa possível, embora com efeitos secundários acentuados.

Uma alternativa a este paradigma passará pela correção de mutações genéticas em genes específicos com recurso à tecnologia CRISPR/Cas9 criando imunidade adaptativa capaz de combater os mecanismos de carcinogenicidade. Neste sentido, a comunidade científica já identificou um número substancial de oncogenes que estão na origem de processos oncológicos (KHAN *et al.*, 2016) e que podem ser alvo de correção ou inativação por terapia génica (Tabela 3).

Modificações epigenéticas como a metilação de DNA e a desacetilação de histonas, regulam a expressão e a repressão genética o que define a proliferação e diferenciação celular. O sistema CRISPR/Cas9 pode ser usado para editar pequenas falhas genéticas que estejam envolvidas na expressão ou silenciamento genético. Demonstrou-se que a supressão da expressão genética foi possível, fundindo a dCas9, que é inativa cataliticamente, com o repressor *Kruppel-associated box*, KRAB, e o potenciador HS2. Observou-se uma alta especificidade na trimetilação da histona H3K9 numa região limitada da cromatina, o que permite inferir que modificando o potenciador conseguimos atingir outras regiões alvo (THAKORE *et al.*, 2016).

Num outro estudo, a fusão da dCas9 com o domínio catalítico da acetiltransferase, cotransfectada com múltiplos gRNAs direcionados para vários promotores endógenos (*IL1RN*, *MYOD* e *OCT4*) e acompanhada da acetilação da histona H3K27 resultou numa alta especificidade dos genes expressados (HILTON *et al.*, 2015). A maior parte dos cancros está associada a uma perda global nos padrões de metilação ou a hipermetilações em *locus* específicos o que aumenta o potencial de utilização da CRISPR/Cas9.

A sobreexpressão do gene *Myc* é responsável por uma grande quantidade de linfomas. Estudos recentes demonstraram que o sistema CRISPR/Cas9 obteve sucesso na modificação do gene supressor tumoral *Trp53*, permitindo regular a expressão do gene *Myc* (MALINA *et al.*, 2013).

Foi usado o mesmo mecanismo no tratamento da leucemia mieloide aguda; desta feita o gene regulado pelo sistema CRISPR/Cas9 foi o *Mll3*, que atua como gene supressor tumoral (CHEN *et al.*, 2014). O tratamento desta doença numa criança de um ano recorrendo às TALENs veio sustentar a possibilidade de terapias com outras endonucleases, como a CRISPR/Cas9, chegarem à clínica (KHAN *et al.*, 2016).

Patologias	Alvo da CRISPR/Cas9	Mecanismo de ação
Cancro do Pulmão	Gene <i>EGFR</i> Genes da <i>Ras</i>	Repressão do <i>EGFR</i> Regulação da <i>Ras</i>
Cancro da Próstata	Genes <i>NANOG</i> e <i>NANOGP8</i>	Repressão do <i>NANOG</i> e do <i>NANOGP8</i>
Linfomas	Gene <i>Trp53</i> Gene <i>Myc</i>	Correção do gene <i>Trp53</i> Regulação da expressão do gene <i>Myc</i>
Leucemia Mieloide Aguda	Gene <i>Mll3</i>	Regulação do <i>Mll3</i>

Tabela 3 Doenças cancerígenas alvo da CRISPR/Cas9. *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*); *Ras* (*Rat Sarcoma virus*); *Trp53* (*Transformation-related p53*); *Myc* (*Myelocytomatosis*); *Mll3* (*Myeloid lineage leukemia protein 3*)

No tratamento do cancro do pulmão o sistema CRISPR/Cas9 tem potencial para atuar de diversas formas. Uma delas surge através da regulação dos oncogenes *Ras* sendo uma alternativa ao uso de RNAs de interferência (SACHDEVA *et al.*, 2015). Genes *Ras* com mutações têm pouca correspondência com o alelo *wild type*, sugerindo que os proto-oncogenes *Ras* podem atuar suprimindo a carcinogenicidade (TO *et al.*, 2014).

O sistema CRISPR/Cas9 pode ser usado na repressão de genes de recetores de fatores de crescimento epidermal (*EGFR*), pode ser usado no combate a resistências associadas aos inibidores da cinase da tirosina (TK), pode ser usado na regulação de enzimas epigenéticas como a DNA metiltransferase (DNMT) e a histona desacetilase (HDAC), entre outros alvos. O facto de poder atuar em múltiplos genes permite-lhe tratar múltiplas mutações em tumores sólidos de células não pequenas (NSCLC) (KHAN *et al.*, 2016; SACHDEVA *et al.*, 2015). O cancro do pulmão é uma patologia em que o sistema CRISPR/Cas9 pode assumir um papel decisivo, não apenas na evolução do conhecimento genético da doença, como também na resolução das suas complicações genéticas.

5.4- Doenças Neurodegenerativas: Síndrome do X Frágil

Tem-se vindo a discutir a aplicação do CRISPR/Cas9 na criação de modelos animais que recriem as mutações genéticas causadoras de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson e a doença de Huntington. Estes modelos animais ao conterem mutações em genes endógenos, fornecem melhores modelos de doença do que os modelos transgênicos que expressam genes mutantes através de promotores exógenos (YANG *et al.*, 2016).

Por outro lado, o Sistema CRISPR/Cas9 permite eliminar a expressão de alguns genes mutantes e possivelmente aliviar a neuropatologia associada a mutações de DNA (Tabela 4).

Patologias	Alvo da CRISPR/Cas9	Mecanismo de ação
Síndrome do X frágil	Gene <i>FMRI</i>	Deleção de tripletos CGG
Parkinson	Gene <i>PARK</i>	Regulação dos genes <i>PARK</i>
Huntington	Gene <i>HTT</i>	Deleção de tripletos CAG
Ataxia de Friedreich	Gene <i>FXN</i>	Deleção de tripletos GAA

Tabela 4 Doenças neurodegenerativas alvo da CRISPR/Cas9. *FMRI* (*fragile X mental retardation I*); *PARK* (*Parkinson*); *HTT* (*Huntington*); *FXN* (*Frataxin*);

A doença de Huntington é causada por uma expansão da região das poliglutaminas da proteína huntingtina, que contribui para a perda de função neuronal. O sistema CRISPR/Cas9 pode ser direcionado para o gene da huntingtina mutante em neurónios dopaminérgicos. Da mesma forma, pode ser usada na doença de Parkinson, que está relacionada com a expressão de proteínas mutantes como a α -sinucleína. O sistema CRISPR/cas9 pode ser usado para a depleção da expressão destes genes através de mecanismos de reparação NHEJ, levando à inativação dos genes nos neurónios dopaminérgicos (YANG *et al.*, 2016).

O silenciamento do gene *fragile X mental retardation I* (*FMRI*) localizado no cromossoma X é causado por uma metilação no DNA devido a uma mutação provocada pela expansão do codão CGG. Enquanto pessoas saudáveis contêm entre 5-55 cópias repetidas do codão CGG, pessoas com a patologia podem ter mais de 200 cópias deste codão e desenvolvem atraso mental (PEARSON *et al.*, 2005).

A deleção das regiões repetidas CGG foi conseguida direcionando a CRISPR/Cas9 para este local em iPSCs, que depois de diferenciadas permitiram a correta expressão do gene *FMRI*. Ao serem removidas estas regiões repetidas verificou-se uma extensiva desmetilação na zona do promotor, abrindo-se a cadeia de cromatina e dando-se início à transcrição do gene *FMRI*. O sucesso desta estratégia de deleção de zonas repetidas de

trinucleótidos pode servir de incentivo para a aplicação do sistema a outras doenças causadas por repetições de nucleótidos (PARK *et al.*, 2015) (Tabela 4).

A capacidade de editar genes mutantes via HDR com DNA corretivo, permite reparar as mutações nas doenças supracitadas. Embora existam poucos estudos na área e a eficiência do sistema CRISPR/Cas9 seja discutível, os rápidos avanços permitem continuar a acreditar nesta terapia como solução para diversas doenças neurodegenerativas (YANG *et al.*, 2016).

6- CRISPR/Cas9 da Bancada do Laboratório à Clínica

A rápida evolução da engenharia genética e a grande quantidade de estudos pré-clínicos do sistema CRISPR/Cas9 realizados em múltiplas doenças fazem-nos acreditar que num futuro próximo este possa ser aplicado na clínica. Os resultados obtidos são animadores, mas devem-nos fazer olhar com atenção para as questões de segurança. Para aplicação clínica é preciso garantir eficiência e especificidade. Para isso é necessário um método eficaz de entrega do sistema CRISPR/Cas9 na célula e garantias de segurança quanto aos efeitos *off-target* (KHAN *et al.*, 2016).

As preocupações éticas devem ser tidas em consideração. É necessário estabelecerem-se *guidelines* específicas e bem detalhadas. Devem existir normas de manipulação de embriões humanos e transparência na partilha de conhecimento na comunidade científica, bem como as questões de acessibilidade económica à terapêutica, devem também ser debatidos (HUNG *et al.*, 2016).

Para os grandes impulsionadores do sistema CRISPR/Cas9 é animador perceber que existem ensaios clínicos com endonucleases, como a ZFN, completos e outros ainda a decorrer em patologias como o HIV (Tabela 5).

Prevê-se que na vanguarda da investigação clínica em CRISPR/Cas9 estejam as patologias oculares, uma vez que o olho apresenta características anatómicas e imunológicas particulares e um número considerável de doenças genéticas hereditárias passíveis de resolução pelo sistema CRISPR/Cas9 (Hung *et al.*, 2016).

Ensaio Clínico de Terapia génica usando <i>Zinc Fingers Nucleases</i> (ZFN)		
Patologia	Objetivos a avaliar	Método de entrega
HIV	- Segurança	- AVs em células T geneticamente modificadas
Neoplasia intraepitelial cervical (HPV 16 e 18)	- Segurança	- Supositórios com ZFN
Hemofilia B	- Segurança e Tolerabilidade	- AAVs recombinantes
Mucopolissacaridose tipo I	- Segurança e Tolerabilidade	- AAVs recombinantes (SB-318)

Tabela 5 Ensaio Clínico com ZFN. HIV (*Virus da Imunodeficiência Humana*); HPV (*Virus do Papiloma Humano*); AVs (*Adenovirus*); AAVs (*Virus Adenoassociados*);

7- Considerações Finais

O percurso feito pelo sistema CRISPR/Cas9 é altamente promissor e proporciona grandes esperanças para a resolução de muitas doenças genéticas.

Muitos estudos referidos anteriormente demonstraram o potencial no tratamento de uma grande quantidade de patologias genéticas e epigenéticas. Se por um lado podemos eliminar um gene, através da clivagem da dupla hélice do DNA e posterior reparação por NHEJ, podemos também corrigir pequenas mutações recorrendo a modelos exógenos usando o mecanismo de HDR. As mudanças epigenéticas que estão na base do silenciamento ou sobre-expressão de alguns genes podem ser reguladas através do direcionamento de formas alteradas do sistema CRISPR/Cas9 para alvos específicos.

A facilidade de manuseamento da Cas9 permite alterações nos seus domínios catalíticos de forma a aumentar a sua eficiência e especificidade, diminuindo os efeitos *off-target*.

Para a aplicação clínica é necessário otimizar os processos de entrega do CRISPR/Cas9, sejam eles *ex vivo* ou *in vivo*. Se por um lado os vetores virais e não virais, bem como as mutações *off-target* requerem mais dados de segurança para utilização *in vivo*, por outro a terapia *ex vivo* com recurso a células somáticas e iPSCs através de reprogramação celular, parece aumentar a percentagem de células corrigidas,

A recente difusão desta tecnologia em estudos pré-clínicos em doenças a nível sanguíneo, viral, cancerígeno e neurodegenerativo mostra o enorme poder desta ferramenta. A passagem para a clínica já foi feita por ferramentas idênticas usando outras nucleases, como é o caso das ZFNs, o que permite prever que num futuro próximo o mesmo será alcançado para o CRISPR/Cas9. É importante salientar que antes da transposição clínica é necessário estabelecer os limites ético-morais de manipulação genética associados a esta tecnologia.

Estes são alguns dos motivos desenvolvidos neste trabalho que levam a acreditar que o percurso feito pelo sistema CRISPR/Cas9 é altamente fascinante e que nos proporciona grandes esperanças para a resolução de muitas doenças genéticas.

Bibliografia

ANDERS, Carolin *et al.* - Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. **Nature**. . ISSN 1476-4687. 513:7519 (2014) 569–73. .1038/nature13579.

BIBIKOVA, Marina *et al.* - Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. **Genetics**. . ISSN 00166731. 161:3 (2002) 1169–1175.

CHEN, Chong *et al.* - NIH Public Access. 25:5 (2014) 652–665.

CHEN, Zhi Ying *et al.* - Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. **Molecular Therapy**. . ISSN 15250016. 8:3 (2003) 495–500.

CONG, Le *et al.* - Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/VCas Systems. **Science**. . ISSN 15378276. 339:6121 (2013) 819–823.

CSASZAR, Elizabeth *et al.* - Rapid expansion of human hematopoietic stem cells by automated control of inhibitory feedback signaling. **Cell Stem Cell**. . ISSN 19345909. 10:2 (2012) 218–229.

CYRANOSKI, David - Embryo editing divides scientists. **Nature**. . ISSN 0028-0836. 519:2015) 272.

DING, Qiurong *et al.* - Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. **Circulation Research**. . ISSN 15244571. 115:5 (2014) 488–492.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. - The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**. . ISSN 0036-8075. 346:6213 (2014) 1258096–1258096.

GILBERT, Luke A. *et al.* - NIH Public Access. . ISSN 1097-4172. 154:2 (2014) 442–451.

GRISSA, Ibtissem; VERGNAUD, Gilles; POURCEL, Christine - The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. **BMC bioinformatics**. . ISSN 14712105. 8:2007) 172.

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

HILL, Chapel *et al.* - HHS Public Access. **Proceedings of SPIE--the International Society for Optical Engineering**. . ISSN 0036-8075. 73:4 (2015) 389–400.

HILTON, Isaac B. *et al.* - Activates Genes From Promoters and Enhancers. 33:5 (2015) 510–517.

HOSPITAL, General *et al.* - HHS Public Access. 6:2 (2015) 356–372.

HSU, Patrick D.; LANDER, Eric S.; ZHANG, Feng - Development and applications of

CRISPR-Cas9 for genome engineering. **Cell**. . ISSN 10974172. 157:6 (2014) 1262–1278.

HUCH, Meritxell *et al.* - Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. **Cell**. . ISSN 10974172. 160:1-2 (2015) 299–312.

HUNG, Sandy S. C. *et al.* - Genome engineering in ophthalmology: Application of CRISPR/Cas to the treatment of eye disease. **Progress in Retinal and Eye Research**. . ISSN 1350-9462. 53:2016).

JINEK, Martin *et al.* - A Programmable Dual-RNA – Guided DNA Endonuclease in Adapted Bacterial Immunity. **Science (New York, N.Y.)**. . ISSN 0036-8075. 337:August (2012) 816–822.

JINEK, Martin *et al.* - RNA-programmed genome editing in human cells. **eLife**. . ISSN 2050084X. 2013:2 (2013) 1–9.

JINEK, Martin *et al.* - Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. **Science (New York, N.Y.)**. . ISSN 1095-9203. 343:6176 (2014) 1247997.

KHAN, Faheem Ahmed *et al.* - CRISPR/Cas9 therapeutics: a cure for cancer and other genetic diseases. **Oncotarget**. . ISSN 1949-2553. 2016).

KIM, Sojung *et al.* - Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. . ISSN 15495469. 2014) 1012–1019.

KONERMANN, Silvana *et al.* - CRISPR-Cas9 complex. 517:7536 (2015) 61422–61427.

KOONIN, Eugene V.; WOLF, Yuri I. - Genomics of bacteria and archaea: The emerging dynamic view of the prokaryotic world. **Nucleic Acids Research**. . ISSN 03051048. 36:21 (2008) 6688–6719.

LI, Hongmei Lisa *et al.* - Efficient genomic correction methods in human iPS cells using CRISPR-Cas9 system. **Methods**. . ISSN 10959130. 101:2016) 27–35.

LIANG, Puding *et al.* - CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. **Protein and Cell**. . ISSN 16748018. 6:5 (2015) 363–372.

LIAO, Hsin-Kai *et al.* - Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. **Nature communications**. . ISSN 2041-1723 (Electronic). 6:2015) 6413.

MAGGIO, Ignazio *et al.* - Adenoviral vector delivery of RNA-guided CRISPR/Cas9 nuclease complexes induces targeted mutagenesis in a diverse array of human cells. **Scientific reports**. . ISSN 2045-2322. 4:2014) 5105.

MAGGIO, Ignazio; GONÇALVES, Manuel A. F. V - Genome editing at the crossroads of delivery, specificity, and fidelity. **Trends in Biotechnology**. . ISSN 18793096. 33:5 (2015)

280–291.

MALI, P.; ESVELT, K. M.; CHURCH, G. M. - Cas9 as a versatile tool for engineering biology. **Nat Methods**. . ISSN 1548-7091. 10:10 (2013) 957–963.

MALINA, Abba *et al.* - Repurposing CRISPR / Cas9 for in situ functional assays Repurposing CRISPR / Cas9 for in situ functional assays. 2013) 2602–2614.

MANUSCRIPT, Author - NIH Public Access. **Nature reviews. Genetics**. 11:3 (2011) 181–190.

MANUSCRIPT, Author; SYNDROMES, Gastrointestinal Polyposis - NIH Public Access. . ISSN 1878-5832. 48:Suppl 2 (2010) 1–6.

MARRAFFINI, Luciano A.; BARRANGOU, R. - Immunity. 54:2 (2015) 234–244.

NAIDOO, Anushka *et al.* - NIH Public Access. . ISSN 00029378. 19:2 (2015) 161–169.

OLSON, Eric N. - HHS Public Access. 345:6201 (2015) 1184–1188.

PARK, Chul Yong *et al.* - Reversion of FMRI Methylation and Silencing by Editing the Triplet Repeats in Fragile X iPSC-Derived Neurons. **Cell Reports**. . ISSN 22111247. 13:2 (2015) 234–241.

PEARSON, Christopher E.; NICHOL EDAMURA, Kerrie; CLEARY, John D. - Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. **Nature reviews. Genetics**. . ISSN 1471-0056. 6:10 (2005) 729–742.

RAN, F. Ann *et al.* - NIH Public Access. . ISSN 1097-4172. 154:6 (2014) 1380–1389.

RICHTER, Corinna; CHANG, James T.; FINERAN, Peter C. - Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR associated (Cas) systems. **Viruses**. . ISSN 19994915. 4:10 (2012) 2291–2311.

SACHDEVA, M. *et al.* - CRISPR/Cas9: molecular tool for gene therapy to target genome and epigenome in the treatment of lung cancer. **Cancer gene therapy**. . ISSN 1476-5500. 22:11 (2015) 509–17.

SANDER, Jeffrey D.; JOUNG, J. Keith - CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting. **Nature Biotechnology**. . ISSN 1546-1696. 32:4 (2014) 347–355.

SAVI??, Nata??a; SCHWANK, Gerald - Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. **Translational Research**. . ISSN 18781810. 2015) 15–21.

SCHWANK, Gerald *et al.* - Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. **Cell Stem Cell**. . ISSN 19345909. 13:6 (2013) 653–658.

SHEHATA, Soraya *et al.* - HHS Public Access. 156:5 (2015) 935–949.

SHUI, Bing *et al.* - The Rise of CRISPR/Cas for Genome Editing in Stem Cells. **Stem Cells International**. . ISSN 16879678. 2016:2016).

- SMITH ET AL., 2006 - NIH Public Access. 153:4 (2014) 910–918.
- SPRING, Cold - Downloaded from genesdev.cshlp.org on July 29, 2010 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press. **Spring**. [s.d.].
- STERNBERG, S. H. *et al.* - DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. **Nature**. . ISSN 1476-4687. 507:7490 (2014) 62–67.
- TAKAHASHI, Kazutoshi *et al.* - Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. **Cell**. . ISSN 00928674. 131:5 (2007) 861–872.
- TEBAS, Pablo *et al.* - Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. **The New England journal of medicine**. . ISSN 1533-4406. 370:10 (2014) 901–10.
- THAKORE, Pratiksha I. *et al.* - HHS Public Access. 12:12 (2016) 1143–1149.
- TS-- , Streptomyces *et al.* - HHS Public Access. . ISSN 1471-0072. 67:3 (2014) 223–230.
- WANG, Ying *et al.* - Page 1 of 29 1. [s.d.] 301–319.
- WU, Yuxuan *et al.* - Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. **Cell Stem Cell**. . ISSN 19345909. 13:6 (2013) 659–662.
- XIE, Fei *et al.* - Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. **Genome Research**. . ISSN 15495469. 24:9 (2014) 1526–1533.
- XUE, H. Y. *et al.* - CRISPR-Cas9 for medical genetic screens: applications and future perspectives. **J Med Genet**. . ISSN 1468-6244. 2015) 1–7.
- YANG, Weili *et al.* - CRISPR/Cas9: Implications for Modeling and Therapy of Neurodegenerative Diseases. **Frontiers in Molecular Neuroscience**. . ISSN 1662-5099. 9:April (2016) 28–31.
- YIN, Hao *et al.* - Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. **Nature biotechnology**. . ISSN 1546-1696. 32:6 (2014) 551–3.
- ZHOU, Yuexin *et al.* - High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. **Nature**. . ISSN 1476-4687. 509:7501 (2014) 487–91.