



Olga Maria da Silva Lopes

REPARAÇÃO GÉNICA DE *iPSC* ATRAVÉS DO SISTEMA *CRISPR/CAS9*

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Luís Pereira Almeida e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Olga Maria da Silva Lopes

REPARAÇÃO GÉNICA DE *iPSC* ATRAVÉS DO SISTEMA *CRISPR/CAS9*

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Luís Pereira Almeida e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Coimbra, 2015

Eu, Olga Maria da Silva Lopes, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011130983, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade 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, 9 de julho de 2015.

(Olga Maria da Silva Lopes)

O Tutor

(Professor Doutor Luís Pereira de Almeida)

A Aluna

(Olga Maria da Silva Lopes)

9 de julho de 2015

ÍNDICE

ABREVIATURAS	6
RESUMO	7
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO	8
REPROGRAMAÇÃO DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM <i>iPSC</i>	9
Vetores de entrega e eficiência de Reprogramação	11
APLICAÇÕES DAS <i>iPSC</i>	13
REPARAÇÃO GÉNICA DE <i>iPSC</i>	14
Reparação génica mediada por <i>ZFNs</i>	16
Reparação génica mediada por <i>TALNs</i>	17
Reparação génica mediada pelo sistema <i>CRISPR/Cas9</i>	18
<i>i. Adaptação</i>	20
<i>ii. Processamento</i>	20
<i>iii. Interferência</i>	20
Aplicação do sistema <i>CRISPR/Cas9</i> na reparação génica de <i>iPSC</i>	24
LIMITAÇÕES E ASPETOS A MELHORAR.....	27
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ANEXOS	42
ANEXO I.....	43
ANEXO II.....	44

ABREVIATURAS

AT	Adenina e Timina
<i>c-Myc</i>	<i>Myelocytomatosis oncogene</i>
CCR5	<i>Cystein-Cystein chemokine receptor type 5</i>
<i>Cre-LoxP</i>	<i>Causes REcombination- LOcus of X over in PI</i>
CRISPR/Cas	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated system</i>
<i>crRNA</i>	<i>CRISPR Ribonucleic Acid</i>
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNMT3B	<i>DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta</i>
DSBs	<i>Double Strand Breaks</i>
DVR	<i>Diresidue Variável Repeat</i>
ESC	<i>Embryonic Stem Cells</i>
EBV	<i>Epstein Barr Virus</i>
<i>Glis1</i>	<i>Glis Family Zinc Finger 1</i>
HBB	<i>Hemoglobin Beta</i>
HDR	<i>Homology-Directed Repair</i>
HIV-1	<i>Human Immunodeficiency Virus - 1</i>
iPSC	<i>induced Pluripotent Stem Cells</i>
<i>Klf4</i>	<i>Krüppel-like factor 4</i>
Knockout	Desativação de um gene
miRNA	<i>micro Ribonucleic Acid</i>
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>
NHEJ	<i>Non-Homologous End Joining</i>
<i>Oct4</i>	<i>Octamer binding transcription factor 4</i>
PAMs	<i>Protospacer-Adjacent Motifs</i>
pb	par de bases
PSC	<i>Pluripotent Stem Cells</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNAase	<i>Ribonucleic Acid nuclease</i>
sgRNA	<i>Single guide Ribonucleic Acid</i>
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<i>Sox2</i>	<i>Sex determining region Y-box 2</i>
TALENs	<i>Transcription Activator-Like Effector Nucleases</i>
<i>tracrRNA</i>	<i>trans-activating CRISPR Ribonucleic Acid</i>
VAA	Vírus Adenoassociados
ZFNs	<i>Zinc Finger Nucleases</i>
ZFPs	<i>Zinc Finger Proteins</i>

RESUMO

As células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC) constituem uma importante fonte celular para terapias personalizadas. Estas células podem ser geneticamente modificadas e diferenciadas em várias linhagens celulares, abrindo portas para o tratamento de doentes por transplantação autóloga. O recente desenvolvimento do sistema de defesa imunitário bacteriano CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/CRISPR-associated nuclease 9*), como metodologia de reparação génica em mamíferos, promete facilitar a manipulação do genoma de iPSC humanas. Trata-se de um método simples, eficiente e de baixo custo que oferece várias vantagens sobre as tecnologias de reparação génica já existentes. A baixa eficiência de reprogramação de iPSC, o risco de mutagénese devido a efeitos fora do alvo causados pelo sistema CRISPR/Cas9, bem como outros problemas relacionados com estas tecnologias, têm limitado a sua aplicação na prática clínica. A aplicabilidade destas ferramentas em humanos justifica a realização de estudos de segurança mais amplos, que permitam compreender e superar as dificuldades que atualmente se apresentam. Ainda assim, estas tecnologias constituem um novo e promissor paradigma para entender e tratar a doença.

Palavras-Chave: iPSC, Transplantação autóloga, CRISPR/Cas9, Reparação génica.

ABSTRACT

Induced pluripotent stem cells (iPSC) are an important cellular source for customized therapies. These cells can be genetically modified and differentiated into several cell lines, opening doors for the treatment of patients by autologous transplant. The recent development of bacterial immune defense CRISPR/Cas9 system (*Clustered Regularly interspaced Short Palindromic Repeat/CRISPR-associated nuclease 9*) as gene repair methodology in mammals, promises to improve the precise manipulation of the genome of human iPSC. This is a simple, efficient and low cost method which provides several advantages over gene repair existing technologies. The low efficiency of iPSC reprogramming, the risk of mutagenesis due to off-target effects caused by CRISPR/Cas9 system as well as other issues related to these technologies, have limited its application in clinical practice. The applicability of these tools in humans justify the realization of broader safety studies that allow understand and overcome the difficulties that currently arise. Still, these technologies are a promising new paradigm for understanding and treating disease.

Keywords: iPSC, Autologous transplantation, CRISPR/Cas9, Gene repair.

INTRODUÇÃO

As células estaminais são células indiferenciadas com capacidade ilimitada de proliferação e auto-renovação. De acordo com o seu potencial para se diferenciarem nos diversos tipos celulares que constituem um organismo, estas podem classificar-se por ordem decrescente de potencialidade em totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou monopotentes (RATAJCZAK *et al.*, 2008).

As Células Estaminais Pluripotentes (PSC) têm a capacidade de se diferenciar em células das três camadas germinativas embrionárias (mesoderme, endoderme e ectoderme), podendo originar todas as células que compõem o corpo humano adulto (RATAJCZAK *et al.*, 2008). Devido ao elevado potencial de proliferação que detêm, as PSC são facilmente cultiváveis *in vitro* (CHENG *et al.*, 2012) assumindo-se como uma ferramenta muito útil para o estudo dos processos de diferenciação celular, para o desenvolvimento de modelos de doenças humanas, testes farmacêuticos e outras aplicações biotecnológicas (KUMAR *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2014b).

As Células Estaminais Embrionárias (ESC) humanas são um tipo de células pluripotentes, que em 1998 foram isoladas pela primeira vez a partir da massa celular interna de blastocistos de embriões humanos (THOMSON *et al.*, 1998; EVANS & KAUFMAN, 1981). Por representarem uma fonte promissora ao nível da transplantação celular têm sido amplamente estudadas, tendo permitido um avanço significativo no campo da medicina regenerativa (CHENG *et al.*, 2012). Contudo, além de ser difícil de suprimir a rejeição imunológica das terapias baseadas em ESC, a geração destas a partir de embriões humanos é controversa tendo vindo a levantar preocupações de ordem ética, religiosa e moral (LO & PARHAM, 2009; SWIJNENBURG *et al.*, 2008).

De forma a ultrapassar o problema têm sido criadas outras estratégias de produção de PSC. A transferência de núcleos somáticos para oócitos enucleados (WILMUT *et al.*, 2007), a fusão de células somáticas com ESC (COWAN *et al.*, 2005; TADA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2006) e a cultura de células somáticas com extratos de células isoladas a partir de ESC (XU *et al.*, 2009) ou oócitos (MIYAMOTO *et al.*, 2009) são exemplos de abordagens alternativas por vezes utilizadas. A falta de eficiência destes processos, as dificuldades técnicas de execução e o aparecimento de ploidias aberrantes nas células geradas (TADA *et al.*, 2001; YING *et al.*, 2002) levaram, no entanto, à diminuição do interesse por essas técnicas (KUMAR *et al.*, 2015).

O entusiasmo pela terapia baseada em células reacendeu-se quando em 2006 TAKAHASHI & YAMANAKA conseguiram reprogramar pela primeira vez células somáticas de rato diretamente em PSC através da sobre-expressão transitória de fatores de transcrição específicos. Estas células foram designadas de Células Estaminais Pluripotentes induzidas (iPSC)

e caracterizam-se por possuírem propriedades morfológicas e de crescimento semelhantes a *ESC* (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006).

A criação de *iPSC* representou uma mudança de paradigma na compreensão da biologia do desenvolvimento e na conceção de novas abordagens terapêuticas, na medida em que a sua utilização permite evitar os problemas éticos associados às *ESC* e criar um substrato específico e histocompatível de cada doente para utilização em terapia celular, contornando os problemas de rejeição imunológica que até então se verificavam com este tipo de terapias (FINOTTI *et al.*, 2015). Por esse motivo as *iPSC* são uma fonte de esperança, não só em termos de aplicações em medicina regenerativa ou na terapia de transplante celular, mas também noutros campos da saúde (IMAIZUMI & OKANO, 2014).

Uma área que tem atraído grande interesse é a correção de doenças genéticas através de *iPSC*, numa perspetiva de terapia celular personalizada. As *iPSC* tornaram a reparação génica mais facilitada, uma vez que estas podem ser submetidas a extensas manipulações sem alterar a estabilidade do genoma ou a sua pluripotencialidade (LI *et al.*, 2014b). Graças ao rápido desenvolvimento de novas tecnologias de edição de genoma é possível atualmente explorar todo o potencial das *iPSC* e modificar de forma precisa qualquer sequência genómica (LI *et al.*, 2014b). São vários os métodos que podem ser utilizados para esse fim, no entanto a recente descoberta de uma ferramenta de reparação génica guiada por *RNA*, denominada *CRISPR/Cas9* (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated system*), oferece várias vantagens sobre os seus homólogos e apresenta potenciais terapêuticos que prometem revolucionar o futuro da terapia génica (XIAO-JIE *et al.*, 2015).

Neste trabalho pretende-se fornecer uma visão geral da metodologia de geração de *iPSC* e das ferramentas de reparação das mesmas, focando especialmente a metodologia baseada no sistema *CRISPR/Cas9*. Serão ainda referenciados ensaios clínicos realizados, patentes e empresas existentes, aspetos regulamentares legais e discutidas as características e limitações dessas tecnologias, bem como a forma como esses fatores influenciam atualmente a utilidade e aplicabilidade destas ferramentas na prática clínica, analisando possíveis soluções e perspetivas futuras.

REPROGRAMAÇÃO DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM *iPSC*

O sucesso da reprogramação de células somáticas em *PSC* através da fusão dos seus núcleos com oócitos ou *ESC*, veio demonstrar que estes últimos continham determinados fatores que eram responsáveis pela indução e manutenção de pluripotência nestas células (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006; YAMANAKA, 2007).

Baseando-se nessa hipótese, e após terem sido testados vários fatores de transcrição, foram geradas iPSC a partir de fibroblastos de rato e de humanos mediante a introdução retroviral dos fatores *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* e *Klf4* (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 2007). Quase em simultâneo, um outro grupo de investigadores da Universidade de Wisconsin nos EUA demonstrou que a combinação dos fatores *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* e *Lin28* era também suficiente para reprogramar células somáticas humanas em iPSC (YU *et al.*, 2007).

As iPSC são células imortais que proliferam rapidamente e formam tumores (teratomas) quando transplantadas em murganhos imunodeficientes, assemelhando-se em muitos aspetos a células tumorais (YAMANAKA, 2007). Por esse motivo pode considerar-se que as iPSC são células reversivelmente “transformadas”. Os fatores de transcrição acima mencionados são essenciais para promover essa transformação e fazem-no através da regulação de vias críticas de sinalização, de modificações epigenéticas e de miRNAs (MIYOSHI *et al.*, 2011).

O *c-Myc* é um fator de transcrição que controla a expressão de uma multiplicidade de genes alvo estando envolvido na proliferação celular, apoptose e auto-renovação. Possui propriedades oncogénicas e está implicado em vários tipos de cancro (BOROOAH *et al.*, 2013). Apesar ao seu poder transformante, o *c-Myc* tem a capacidade de provocar a apoptose dependente da proteína *p53* (YAMANAKA, 2007). Para reverter essa situação recorre-se ao *Klf4*, um membro da família de fatores de transcrição de dedos de zinco tipo Krüppel, que está envolvido na proliferação, diferenciação e sobrevivência (BOROOAH *et al.*, 2013), e que é capaz de suprimir a apoptose induzida pela proteína *p53* e pelo *c-Myc* (ROWLAND *et al.*, 2005). Por outro lado, o *Klf4* ativa a proteína *p21* suprimindo a proliferação celular, sendo neste caso o *c-Myc* a aliviar o efeito citostático do *Klf4* através da supressão da proteína *p21*. Assim, o equilíbrio entre *c-Myc* e *Klf4* pode desempenhar um papel crítico no processo de transformação de células somáticas em iPSC (YAMANAKA, 2007). O *c-Myc* assume ainda um papel importante ao nível da abertura e ativação da cromatina, característico das PSC (MESHORER *et al.*, 2006), nomeadamente através da ligação da proteína Myc a vários locais do genoma e através do recrutamento de vários complexos de acetilação das histonas (KNOEPFLER *et al.*, 2006). Esta função é importante porque os efeitos do *c-Myc* sobre a estrutura da cromatina permitem que o fator *Oct4* ative ou suprima genes alvo adequados, dirigindo o processo de transformação no sentido da formação de iPSC e não de células tumorais como aconteceria se fossem utilizados unicamente os fatores de reprogramação *c-Myc* e *Klf4* (YAMANAKA, 2007).

O fator de transcrição *Oct4* é necessário para a manutenção da pluripotência das células estaminais e desempenha um papel crucial não só no desenvolvimento embrionário precoce, mas também no desenvolvimento das células germinativas e das PSC cultivadas (BOROOAH *et al.*, 2013; WANG & DAI, 2010). O *Oct4* interage ainda com proteínas do grupo *Policomb*, que são importantes repressores da transcrição (WANG & DAI, 2010). Todavia, a utilização do *Oct4* por si só não é suficiente para induzir pluripotência, necessitando do fator *Sox2* como seu co-ativador (YAMANAKA, 2007). O complexo formado pelo *Oct4/Sox2* atua em sinergia ligando-se às sequências promotoras de múltiplos genes alvo, incluindo os genes *Oct4* e *Nanog*, regulando positivamente a sua transcrição (MASUI *et al.*, 2007; YAMANAKA, 2007). A *Sox2* é por isso importante para o desenvolvimento inicial e necessária para manter a auto-renovação das células estaminais indiferenciadas (BOROOAH *et al.*, 2013). O fator *Nanog* é expresso em células não diferenciadas e é responsável por impedir o processo de diferenciação (BOROOAH *et al.*, 2013). O fator *Lin28* promove a expressão de *Oct4* ao nível pós-transcricional por ligação direta ao seu mRNA (QIU *et al.*, 2010) desempenhando um papel ativo na auto-renovação celular (BOROOAH *et al.*, 2013). Atuando como um co-fator do *Oct4*, do *Sox2* e do *Nanog* (CHAMBERS *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2008; NAKATAKE *et al.*, 2006; NIWA *et al.*, 2009), a sobre-expressão do fator *Klf4* permite melhorar ainda mais a capacidade de auto-renovação destas células (LI *et al.*, 2005).

Vetores de entrega e eficiência de Reprogramação

A reprogramação de iPSC é um processo pouco eficiente e demorado, uma vez que apresenta taxas de eficiência inferiores a 1% (YAMANAKA, 2007) e demora em média entre dez e trinta dias (HU, 2014a). São vários os desafios que se levantam quando se pretende reprogramar células somáticas em iPSC, estando a segurança, eficiência e reprodutibilidade do processo dependentes não apenas dos fatores de transcrição utilizados, mas também dos métodos usados para introduzir esses mesmos fatores.

Os vetores utilizados para proceder à reprogramação celular estão descritos na Tabela I do Anexo I, são diversos e podem de uma forma geral classificar-se em virais e não virais (KULMAR *et al.*, 2015).

Os vetores virais foram os primeiros a ser usados para reprogramar células diferenciadas em iPSC (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006; YU *et al.*, 2007) e consistem em vírus geneticamente modificados que transportam no seu genoma os genes responsáveis pela expressão ectópica dos fatores de transcrição necessários ao processo de reprogramação.

Vários tipos de vírus têm sido empregues para reprogramar *iPSC*, desde Retrovírus, Lentivírus, Adenovírus e vírus *Sendai* (KULMAR *et al.*, 2015). Os Retrovírus são vetores capazes de integrar o genoma de células em divisão tendo sido os primeiros a ser utilizados na reprogramação eficaz de *iPSC* (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 2007). Os vírus do género Lentivírus pertencem à família dos retrovírus e além de infetarem células em proliferação, são também capazes infetar células que não estão em processo de divisão (RAO & MALIK, 2012). Por esse motivo, a aplicação de Lentivírus torna-se mais abrangente, possibilitando a sua utilização numa gama mais ampla de células somáticas. Esta característica é importante porque, devido a variações na expressão endógena de fatores de transcrição, a eficiência e a facilidade de reprogramação diferem com o tipo celular utilizado (BOROOAH *et al.*, 2013).

Por se tratarem de vírus integrativos, os vetores baseados em Retrovírus e Lentivírus possuem uma elevada eficiência de reprogramação (HU, 2014a) e uma elevada expressão dos fatores de transcrição integrados (KULMAR *et al.*, 2015). No entanto, a abordagem viral possui uma capacidade de carga limitada a um máximo de 7 kb, e apesar de não ocorrer de forma aleatória, a inserção múltipla de transgenes no genoma pode desregular genes endógenos (KULMAR *et al.*, 2015). Embora a expressão dos transgenes seja silenciada por mecanismos epigenéticos após a indução do estado de pluripotência, podem permanecer baixos níveis de expressão e assim comprometer a diferenciação das *iPSC* geradas (CHUN *et al.*, 2010; YOSHIDA & YAMANAKA, 2010). Além disso, a reativação da expressão de transgenes oncogénicos, tais como *c-Myc* pode causar o desenvolvimento de tumores após a transplantação de células derivadas de *iPSC* (OKITA *et al.*, 2007). A substituição do fator de reprogramação *c-Myc* pelo *Glis1* (MAEKAWA *et al.*, 2011) ou a sua remoção dos protocolos de produção de *iPSC* são abordagens que têm vindo a ser implementadas, embora neste último caso a eficiência de reprogramação seja significativamente reduzida (NAKAGAWA *et al.*, 2008). O aparecimento de reações imunogénicas após a transplantação de derivados de *iPSC* (ZHAO *et al.*, 2011) é outro problema resultante da utilização de vírus integrativos na reprogramação celular.

Os Adenovírus permitem a expressão transitória de genes exógenos, sem integração no genoma do hospedeiro, embora com uma baixa eficiência em comparação com os vetores integrativos (STADTFELD *et al.*, 2008). Apesar de serem considerados vetores não integrativos, a sua utilização é limitada pelo facto de poderem integrar-se espontaneamente no genoma, pela sua ineficiência e necessidade de títulos virais elevados, pela reduzida

variedade de tipos celulares reprogramáveis pelo método (hepatócitos e fibroblastos humanos) e pela expressão transiente que proporcionam (HU, 2014a).

Os vírus *Sendai* são um outro tipo de vírus não integrativo que possibilita a produção eficiente de *iPSC* (FUSAKI *et al.*, 2009; HU, 2014a). Permitem substituir os Retrovírus uma vez que são vírus de *RNA* de cadeia simples que replicam no citoplasma e que podem facilmente ser removidos depois da reprogramação, sendo considerados vetores seguros (ZHOU & ZENG, 2013). Apesar das suas vantagens, os vírus *Sendai* requerem uma preparação cuidada, são caros e necessários em grandes quantidades. Além disso, são vírus com potencial imunogénico e que têm de ser removidos no fim do processo (HU, 2014a).

De uma forma geral, a reprogramação baseada em vírus apresenta diversos riscos, incluindo mutagénesse por inserção, expressão residual e reativação de fatores de reprogramação, silenciamento não controlado de transgenes, apoptose, senescência celular e forte imunogenicidade (HU, 2014a). Devido a estes inconvenientes a utilização de vetores virais em terapia clínica é considerada um risco e como tal têm sido desenvolvidas abordagens mais seguras que eliminem ou minimizem estes problemas (ZHOU & ZENG, 2013).

As estratégias passam essencialmente pela redução ou eliminação completa de transgenes (HU, 2014a) e pela utilização de vetores não virais sem capacidade de integração no genoma (ZHOU & ZENG, 2013). Tais abordagens incluem (I) a utilização de vetores policistrónicos para reduzir o número de integrações; (II) a utilização do sistema *Cre-LoxP* para remover transgenes a partir do genoma reprogramado; (III) a utilização do transposão *PiggyBac* para inserção de transgenes no genoma em reprogramação e excisão subsequente; (IV) a entrega direta de *RNA* de reprogramação para evitar integração de transgenes, nomeadamente através de *mRNA* sintético, vírus de *RNA*, replicões de *RNA* ou *miRNA*; (V) a transfecção repetida de plasmídeos não replicativos de expressão transiente; (VI) a transdução de proteínas; (VII) o uso de plasmídeos epissomais replicativos não integrativos; e (VIII) a utilização de pequenas moléculas promotoras da reprogramação (HU, 2014a).

APLICAÇÕES DAS *iPSC*

As *iPSC* constituem uma ferramenta única uma vez que podem ser geradas a partir de células isoladas diretamente do doente e adquirir capacidade de auto-renovação ilimitada mantendo um cariótipo normal (TAKAHASHI *et al.*, 2007). Após a reprogramação, as *iPSC* podem ser diferenciadas nos tipos celulares necessários, como por exemplo neurónios (DIMOS *et al.*, 2008), células cardíacas (LIANG & DU, 2014), células pancreáticas (KOBAYASHI *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2009), células do fígado (SONG *et al.*, 2009), células

sanguíneas (CHICHA *et al.*, 2011), enterócitos (SPENCE *et al.*, 2010) ou outros. Estas propriedades fazem das *iPSC* um bom modelo para o estudo de doenças humanas *in vitro* e para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas (KAUFMANN *et al.*, 2013). Isto é especialmente importante em doenças raras, onde o substrato de estudo é muito limitado, como a Esclerose Lateral Amiotrófica, a Doença de Parkinson, a Doença de Huntington, a Doença de Machado Joseph, a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), a Síndrome de Down, a Síndrome de Willi Prader, entre muitas outras não menos importantes (CHUN *et al.*, 2010; IMAIZUMI & OKANO, 2014). Assim, as *iPSC* permitem estudar a evolução das doenças e dos seus fenótipos desde a fase de desenvolvimento até à fase mais tardia, servindo como plataformas de descoberta e de triagem para identificar vias de sinalização comuns e descobrir terapias moleculares que possam potencialmente reverter o fenótipo da doença (KAUFMANN *et al.*, 2013).

Outra aplicação importante das *iPSC* é a transplantação de células saudáveis após a reparação génica de mutações causadoras de doenças genéticas (Anexo II - Figura 2). Esta estratégia foi aplicada com sucesso pela primeira vez num modelo animal de anemia falciforme (HANNA *et al.*, 2007), e tem vindo a ser estudada a sua aplicação em humanos para o tratamento de várias patologias (CHOI *et al.*, 2013; MA *et al.*, 2013). Em princípio, esta abordagem pode ser aplicada a qualquer doença humana para as quais a mutação subjacente seja conhecida, e que possam ser tratadas através do transplante celular (CHUN *et al.*, 2010).

A combinação da terapia génica e da terapia celular utilizando *iPSC* representa, assim, uma opção terapêutica muito promissora para reparar defeitos genéticos em doenças monogénicas, oferecendo boas perspetivas para o tratamento de várias patologias (KAUFMANN *et al.*, 2013).

REPARAÇÃO GÉNICA DE *iPSC*

A terapia génica envolve a manipulação do genoma, por correção, substituição ou eliminação de genes defeituosos, com vista ao tratamento ou prevenção de doenças (XIAO-JIE *et al.*, 2015). A utilização de *iPSC* com esse fim apresenta-se como uma fonte muito promissora para a cura de doenças para as quais não tem sido possível dar uma resposta efetiva até então. As doenças hematológicas, (KAUFMANN *et al.*, 2013; GOULD, 2014), cancerígenas (BRENNER *et al.*, 2013), neurodegenerativas (ALLEN & FEIGIN, 2014), cardíacas, (BRAUNWALD *et al.*, 2015), SIDA (MANJUNATH *et al.*, 2013) e diabetes (MORRÓ *et al.*, 2014; GERACE *et al.*, 2015) são alguns exemplos.

Para que seja possível reparar geneticamente as *iPSC* têm de ocorrer duas etapas importantes. O primeiro passo consiste na criação, através da utilização de nucleases específicas, de ruturas na cadeia dupla (*DSBs*) de *DNA*, que serão posteriormente reparadas numa segunda fase (CHENG *et al.*, 2012). A reparação de *DSBs* pode ocorrer principalmente por união de extremidades não-homólogas (*NHEJ*), que liga simplesmente as extremidades resultantes da rutura, restaurando a sequência original ou criando pequenas inserções ou deleções (*indels*); ou por Recombinação Homóloga Direta (*HDR*) que faz uso de um segmento de *DNA* homólogo como molde para orientar a síntese de uma nova cadeia (Anexo II - Figura 2) (LI *et al.*, 2014b; SYMINGTON & GAUTIER, 2011). Dos dois mecanismos, a *HDR* é a única via que permite alcançar uma reparação fiel do *DNA* alterado (SYMINGTON & GAUTIER, 2011), uma vez que não dá origem a *indels*, possibilitando também a introdução exógena de sequências genómicas de interesse (LI *et al.*, 2014b).

A inserção de *DSBs* no genoma faz-se pela utilização de nucleases programáveis que possuem atividade catalítica em regiões reconhecidas como sequências alvo (LI *et al.*, 2014b). Têm sido desenvolvidas várias abordagens para a produção de nucleases sintéticas que permitam manipular o genoma de forma eficaz e segura, e incluem nucleases dedos-de-zinco (*ZFNs*), nucleases efetoras como ativador de transcrição (*TALENs*) e mais recentemente o sistema *CRISPR/Cas9* (XIAO-JIE *et al.*, 2015). O uso de nucleases programáveis permite ativar/inativar genes, substituir ou eliminar sequências específicas e até rearranjos cromossómicos (KIM & KIM, 2014; LI *et al.*, 2014b). Por esse motivo, apresenta-se como uma ferramenta preferível para a terapia génica quando comparada com ferramentas anteriores que se limitavam a inserir uma cópia de *DNA* exógeno no núcleo da célula-alvo ou no genoma, e que estariam na origem de efeitos colaterais como mutações por inserção (XIAO-JIE *et al.*, 2015).

Sempre que o processo de reparação do genoma passe pela substituição ou inserção de genes, é necessário entregar, juntamente com as nucleases de restrição, o vetor que contém os genes que servirão de modelo para a síntese de novas cadeias de *DNA* em locais com *DSBs* (CHENG *et al.*, 2012). Tal como na reprogramação, a reparação génica de *iPSC* depende da utilização de determinados vetores (Anexo I - Tabela I) para fazer essa entrega (KAUFMANN *et al.*, 2013). As características e limitações das metodologias de reparação génica são discutidas de seguida neste documento.

Reparação génica mediada por ZFNs

ZFNs consistem em duas unidades que operam em conjunto, cada uma contendo um domínio de ligação ao DNA, composto por séries de sequências Cys₂-His₂ de proteínas dedo-de-zinco (ZFPs), ligado a um domínio de clivagem constituído pela endonuclease de restrição FokI (CARROLL, 2011; CHENG *et al.*, 2012). As duas unidades das ZFNs são concebidas para se ligarem a lados opostos do local de destino com os domínios da respetiva FokI orientados um para o outro. Quando as endonucleases FokI dimerizam, são então capazes de produzir DSBs em qualquer parte do genoma. A especificidade da ligação ao genoma é conferida pela ligação das várias sequências das ZFPs em tandem, ligando-se cada uma delas a três nucleótidos específicos (LI *et al.*, 2014b). A especificidade das ZFNs será tanto maior quanto maior for o número de sequências de ZFPs disponíveis para a ligação, embora a utilização de apenas três sequências (18 pb) seja suficiente para assegurar o reconhecimento do local a reparar (BHAKTA *et al.*, 2013). Estas características permitem às ZFNs desenvolver uma ação dirigida a um único local do genoma (LI *et al.*, 2014b).

Quando bem desenhadas, as ZFNs demonstram ser ferramentas eficazes na eliminação, adição ou correção genética em iPSC, tendo sido utilizadas com sucesso para reparar o genoma de muitos organismos, incluindo humanos (CARROLL, 2011, URNOV *et al.*, 2010). Exemplos disso são, a produção de células apresentadoras de antígeno para vacinação (HARUTA *et al.*, 2013), a correção do desequilíbrio de globina na α -talassemia mediante a utilização de Vírus Adenoassociados (VAA) (CHANG & BOUHASSIRA, 2012), e a correção da deficiência em α 1-antitripsina através da combinação de ZFNs com vetor transposição *PiggyBac* (YUSA *et al.*, 2011).

Apesar dos casos de sucesso da aplicação de ZFNs na reparação génica de iPSC humanas, a utilização destas nucleases é limitada devido a vários problemas (GABRIEL *et al.*, 2011). Por um lado, a afinidade de ligação das sequências individuais é dependente do contexto, podendo ter afinidade para quatro pb em vez de três, alterando a sua sequência de reconhecimento. Por esse motivo, a criação e seleção de cada sequência tem de ser feita de uma forma dependente do contexto para obter ZFPs altamente específicas, sendo um processo trabalhoso e demorado (RAMALINGAM *et al.*, 2013). Além disso, e apesar de teoricamente aumentar a eficiência de geração de DSBs num *locus* específico, a utilização de ZFNs parece não melhorar a frequência de HDR em iPSC (CHENG *et al.*, 2012).

Outra das grandes preocupações está relacionada com a clivagem de sequências genómicas não desejadas que provoquem citotoxicidade, introduzam mutações desconhecidas e confundam a análise dos efeitos das alterações genéticas pretendidas (LI *et al.*, 2014b;

PATTANAYAK *et al.*, 2011). A atividade fora do alvo pode ser minimizada redesenhando as sequências de reconhecimento de ZFPs, ou modificando o domínio da endonuclease para promover a formação de heterodímeros ao invés de homodímeros (DOYON *et al.*, 2011; MILLER *et al.*, 2007). Mesmo com estas melhorias técnicas, é necessária uma monitorização apertada dos resultados para avaliar a efetividade e segurança do uso desta tecnologia.

Reparação génica mediada por TALENs

Tal como as ZFNs, as TALENs são proteínas quiméricas constituídas por um domínio programável de ligação ao DNA, unido ao domínio da nuclease FokI (LI *et al.*, 2014b). Constituem uma alternativa às ZFNs na indução de DSBs e são naturalmente segregadas por bactérias do género *Xanthomonas* (JOUNG & SANDER, 2013; LI *et al.*, 2014b). Estas proteínas foram inicialmente identificadas pela capacidade de se ligarem a sequências específicas no genoma de plantas infetadas, ativando a transcrição (HARRISON *et al.*, 2014). O domínio de ligação ao DNA é composto por repetições múltiplas de 33-35 aminoácidos dispostas em tandem, reconhecendo cada uma dessas repetições um único nucleótido na sequência de DNA alvo (CHENG *et al.* 2012; HARRISON *et al.*, 2014). A especificidade de reconhecimento é determinada por uma região hipervariável de dois aminoácidos presente nas posições 12 e 13 de cada repetição, referida como "Diresidue Variável Repeat" (DVR) (CHENG *et al.*, 2012). O código de reconhecimento de DNA proporciona, assim, uma correspondência de um-para-um entre o conjunto de repetições de aminoácidos e a sequência de nucleótidos do DNA alvo, não havendo interferência de módulos vizinhos como acontece com as ZFNs (RAMALINGAM *et al.*, 2013). Além disso, a relação entre o sítio de ligação preferencial de uma TALEN e as suas sucessivas DVRs parece constituir um código simples, onde cada repetição é específica da base de ligação. Como tal, as TALENs podem ser manipuladas para induzir DSBs no genoma com elevada precisão (CHRISTIAN *et al.*, 2010). Embora não se possa excluir totalmente o aparecimento de efeitos fora do alvo, este acontecimento é raro com a utilização de TALENs, sendo também uma vantagem desta tecnologia relativamente às ZFNs (DING *et al.*, 2013).

Devido a estas características, e apesar de apresentarem a mesma eficácia de corte, as TALENs possuem citotoxicidade significativamente menor quando comparadas com as ZFNs (RAMALINGAM *et al.*, 2013), tornando-as uma ferramenta de reparação génica mais segura. Por outro lado, a sua produção é mais fácil e rápida, facilitando a criação de modelos de doença em iPSC (DING *et al.*, 2013; HOCKEMEYER *et al.*, 2011). A correção genética da β -talassemia através da aplicação de TALENs em iPSC derivadas do doente evidencia a importância e a aplicabilidade desta tecnologia na terapia génica (MA *et al.*, 2013). Outros exemplos de sucesso

envolvem a reparação genética da epidermólise bolhosa distrófica recessiva, uma doença genética caracterizada por um défice funcional da proteína de colagénio do tipo VII (OSBORN *et al.*, 2013), e da doença Niemann-Pick tipo C, um distúrbio genético que impede o normal armazenamento de lipídios causando neurodegeneração grave e disfunção hepática (MAETZEL *et al.*, 2014).

Apesar das suas vantagens, muitas questões relacionadas com a utilização de TALENs ainda têm de ser resolvidas. Um dos problemas relaciona-se com a necessidade da existência de uma base Timina precedente ao local de reconhecimento para que este se processe (BOCH *et al.*, 2009; MOSCOU & BOGDANOVA, 2009). O problema mais grave parece estar relacionado com a sensibilidade das TALENs à 5-metilcitosina devido à prevalência desta modificação do DNA no genoma (BULTMANN *et al.*, 2012; VALTON *et al.*, 2012). Este problema poderá ser ultrapassado pela criação de TALENs com domínios de ligação ao DNA insensíveis à 5-metilcitosina (VALTON *et al.*, 2012).

Reparação génica mediada pelo sistema CRISPR/Cas9

O sistema CRISPR/Cas é um sistema imunológico adaptativo altamente eficiente, identificado em espécies pertencentes aos domínios *Bacteria* e *Archaea*, que reconhece e destrói o genoma de agentes patogénicos como bacteriófagos ou plasmídeos bacterianos (MARRAFFINI & SONTHEIMER, 2010). Este sistema de defesa baseia-se na incorporação dos fragmentos genómicos invasores no locus CRISPR, que uma vez transcrito origina um CRISPR RNA (*crRNA*) que serve de guia a nucleases do tipo Cas para a degradação de sequências homólogas (TERNS & TERNS, 2011). O sistema CRISPR/Cas envolve assim o funcionamento conjunto de alguns componentes críticos, nomeadamente uma matriz CRISPR, uma sequência líder a montante, os genes *tracrCRISPR* e os genes Cas (RICHTER *et al.*, 2012).

A matriz CRISPR é constituída por sequências repetidas que alternam com sequências espaçadoras (YAN & WEI, 2013). As sequências de repetição são geralmente compostas por 24 a 47 pb e são idênticas entre si, embora possam ocorrer algumas diferenças como acontece com a repetição presente no final da matriz, que é frequentemente truncada (GRISSA *et al.*, 2007; LILLESTØL *et al.*, 2006). Ao invés destas, as sequências espaçadoras apresentam-se como sequências únicas e são responsáveis pela imunidade conferida pelo sistema. Estes espaçadores resultam da integração na matriz CRISPR de “protoespaçadores”, isto é, fragmentos genéticos do agente patogénico invasor (HARRISON *et al.*, 2014). O seu tamanho pode ser variável embora geralmente seja semelhante ao das repetições da mesma matriz (GRISSA *et al.*, 2007). É importante também referir que um genoma pode conter mais do que

uma matriz *CRISPR* e que estas podem apresentar dimensões variáveis dependendo da capacidade de aquisição de novos espaçadores, sendo tanto mais longas quanto maior esta for (HORVATH *et al.*, 2008; RICHTER *et al.*, 2012).

A sequência líder está localizada a montante da primeira repetição e é quem regula, através de um promotor, todos os processos de transcrição que ocorrem na matriz (JANSEN *et al.*, 2002). Esta sequência é rica em bases AT e é constituída por cerca de 200-500 pb (PUL *et al.*, 2010). Além de regular a transcrição, a sequência líder é também importante para a aquisição de novos espaçadores que são adicionados à sua extremidade proximal na matriz *CRISPR* (RICHTER *et al.*, 2012; YOSEF *et al.*, 2012).

A expressão da matriz *CRISPR* dá origem a transcritos primários longos, que constituem os precursores do *crRNA*, designados de pré-*crRNA*. Estes pré-*crRNA* são posteriormente tratados, através de um processo de maturação, de onde resultam *crRNAs* que contêm apenas um único espaçador ladeado por fragmentos parciais de repetição (BHAYA *et al.*, 2011). Para que este processo de maturação ocorra é necessária a presença de um RNA não codificante de proteínas, denominado trans-ativador de *CRISPR RNA* (*tracrRNA*) (MALI *et al.*, 2013a; KARVELIS *et al.*, 2013). O *tracrRNA* constitui um componente indispensável ao sistema *CRISPR/Cas* e os genes que o codificam estão também localizados no *locus CRISPR* (MALI *et al.*, 2013a).

Associado à matriz *CRISPR* podem ainda ser encontrados os genes que codificam as proteínas *Cas* (JANSEN *et al.*, 2002). Estas proteínas podem ser de vários tipos e são importantes pois, além de fornecerem a maquinaria enzimática necessária para a aquisição de novos espaçadores, estão diretamente envolvidas no processo de eliminação de agentes invasores (RICHTER *et al.*, 2012). De acordo com a sequência e estrutura destas proteínas, o sistema *CRISPR/Cas* pode ser classificado em três tipos (I, II e III) (MAKAROVA *et al.*, 2011). Nos tipos I e III várias proteínas *Cas* devem estar complexadas com o *crRNA* para que este possa exercer a sua função (SINKUNAS *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2012), no entanto, o tipo II requer apenas a presença da proteína *Cas9* (DELTCHEVA *et al.*, 2011; SAPRANAUSKAS *et al.*, 2011). A proteína *Cas9* é uma nuclease capaz de clivar de forma específica a cadeia dupla de DNA gerando *DSBs* de 3 pares de bases a montante da extremidade 3' do protoespaçador (MALI *et al.*, 2013a; XU *et al.*, 2014). Trata-se de uma proteína grande, com múltiplos domínios, sendo o processo de clivagem mediado por um domínio de nuclease *HNH* que cliva a cadeia do protoespaçador complementar ao *crRNA* e por um domínio nuclease semelhante ao *RuvC* que cliva a cadeia não complementar (MALI *et al.*, 2013a; XU *et al.*, 2014). É importante referir que a ligação e a ação nuclease da *Cas9* dependem necessariamente da presença de curtas

sequências de nucleótidos altamente conservadas (5'-NGG-3') junto ao protoespaçador, designadas de "Protospacer-Adjacent Motifs" (PAMs) (XU *et al.*, 2014). Além da sua ação nucleásica sobre o protoespaçador, a Cas9 participa ainda no processo de maturação do crRNA em conjunto com o tracrRNA e uma RNAase III endógena do hospedeiro (MALI *et al.*, 2013a).

O sistema CRISPR/Cas do tipo II é exclusivo de bactérias (ex. *Streptococcus pyogenes*) e a sua ação consiste em três etapas principais, a adaptação, o processamento e a interferência (ALKHNBASHI *et al.*, 2014), representadas na Figura 1 e discutidas de seguida.

i. Adaptação

A fase de adaptação consiste na excisão, por ação de proteínas Cas, de fragmentos genéticos do DNA dos agentes patogénicos invasores desconhecidos. Esses fragmentos correspondem às sequências que constituem os protoespaçadores e são inseridos como novos espaçadores ao lado da sequência líder, entre repetições consecutivas de uma matriz CRISPR (ALKHNBASHI *et al.*, 2014).

Esta etapa pode também ser denominada de "fase de imunização" dado que o sistema CRISPR armazena a assinatura molecular de um agente infeccioso para se proteger de uma próxima infeção (MALI *et al.*, 2013a).

ii. Processamento

Quando acontece uma segunda infeção pelo mesmo agente patogénico, é transcrita a informação genética armazenada na matriz CRISPR durante a fase de adaptação. Dessa transcrição resulta, como já foi mencionado, o pré-crRNA. Neste ponto, o tracrRNA, também transcrito, vai hibridizar com as sequências repetidas do pré-crRNA formando um complexo com este e com a Cas9. Num segundo momento uma RNAase III endógena vai clivar o complexo hibridizado crRNA-tracrRNA e remover a extremidade 5' de cada espaçador, obtendo-se crRNAs maduros que permanecem associados ao tracrRNA e à Cas9 (MALI *et al.*, 2013a).

iii. Interferência

Na fase de interferência cada complexo ribonucleoproteína crRNA-tracrRNA-Cas9 reconhece o protoespaçador na dupla cadeia de DNA do agente invasor, com o qual vai estabelecer ligação pela via de emparelhamento de bases Watson-Crick. Esse reconhecimento é mediado pelo crRNA que é complementar a essa sequência (GASIUNAS *et al.*, 2012; JINEK *et al.*, 2012). Uma vez reconhecido o alvo, a nucleásica Cas9 vai clivar o DNA indesejado através

dos seus domínios catalíticos, originando *DSBs* capazes de inativar o agente agressor (YAN & WEI, 2013).

Além do reconhecimento da sequência alvo pelo *crRNA*, a ação da *Cas9* está também dependente, como já referido, da presença da sequência 5'-NGG do *PAM* junto ao local de complementaridade. O *PAM* é um componente essencial que permite distinguir o próprio do não próprio, evitando que o sistema *CRISPR/Cas9* direcione a sua ação contra si mesmo (HARRISON *et al.*, 2014). Muitos sistemas *CRISPR/Cas* do tipo II requerem diferentes *PAMs*, o que pode dificultar a sua utilização em terapia génica (HORVATH *et al.*, 2008), como veremos mais à frente.

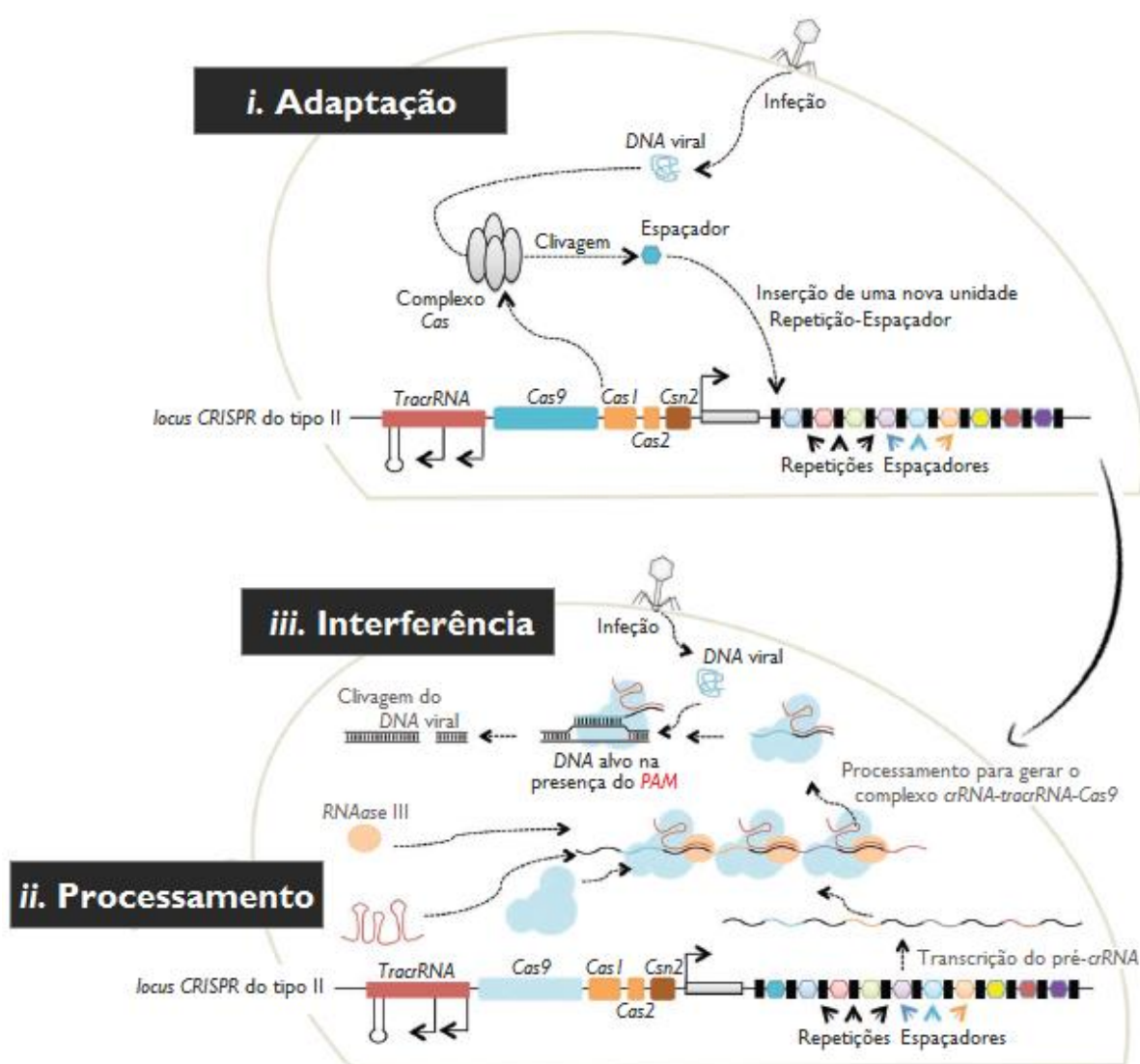


Figura I – Representação esquemática das etapas de funcionamento do sistema de defesa bacteriano *CRISPR/Cas9* do tipo II. (imagem adaptada de MALI *et al.*, 2013)

Devido à simplicidade do sistema *CRISPR/Cas9*, têm sido desenvolvidas estratégias para a aplicação desta tecnologia na reparação génica e controlo transcripcional (CHO *et al.*, 2013;

CONG *et al.*, 2013). A versatilidade do sistema como uma ferramenta de edição genómica resulta da sua capacidade de reconhecer virtualmente qualquer sequência no genoma e introduzir uma rutura controlada no DNA (SINGH *et al.*, 2015).

A implementação do sistema CRISPR/Cas9 em mamíferos requer a reconstituição adequada do complexo ribonucleoproteína *crRNA-tracrRNA-Cas9* (MALI *et al.*, 2013a). Para tal pode recorrer-se à entrega direta da Cas9 recombinante purificada ou do seu mRNA, juntamente com o *crRNA* e o *tracrRNA* (LI *et al.*, 2014b), ou à expressão heteróloga da Cas9 em codões otimizados com um sinal de localização nuclear apropriado e introdução de um vetor plasmídico contendo o *crRNA* e o *tracrRNA* regulado por um promotor de RNA polimerase III (CONG *et al.*, 2013; JINEK *et al.*, 2013; MALI *et al.*, 2013b). Embora a expressão/entrega do *crRNA* e do *tracrRNA* possa ser feita individualmente, foi desenvolvido, para facilitar o processo, um RNA quimérico através da fusão do *crRNA* com o *tracrRNA*, ao qual se deu o nome de “*single guide RNA*” (*sgRNA*) (JINEK *et al.*, 2012). O *sgRNA* possui uma sequência guia de 20 nucleótidos complementar ao DNA alvo, que pode ser reprogramada em função da sequência alvo de interesse (RAN *et al.*, 2013a). Devido ao seu tamanho reduzido, é possível realizar a reparação *multiplex* de genes alvo através da introdução simultânea de vários *sgRNA* (CONG *et al.*, 2013). Assim, em virtude da sua maior simplicidade e de um direcionamento mais robusto, o *sgRNA* tem sido preferencialmente utilizado na reparação efetiva do DNA de organismos eucariotas (CHO *et al.*, 2013; CONG *et al.*, 2013; JINEK *et al.*, 2013; MALI *et al.*, 2013b).

Da mesma forma que as ZFNs e as TALENs, o sistema CRISPR/Cas9 promove a reparação do genoma estimulando a formação de DSBs (HSU & ZHANG, 2012; URNOV *et al.*, 2010), que são posteriormente corrigidas por NHEJ ou por HDR (RAN *et al.*, 2013a). Na ausência de um molde de reparação, dá-se o processo de NHEJ que está na origem de *indels* e que pode ser útil para promover o *knockout* de genes (PEREZ *et al.*, 2008). Quando o objetivo da reparação génica passa pela introdução de genes exógenos, a HDR é a via mais apropriada (Anexo II - Figura 2), apesar de ser um processo que ocorre normalmente em frequências mais baixas que a NHEJ (RAN *et al.*, 2013a). Neste caso, o fragmento de reparação pode ser entregue sob a forma de dupla cadeia de DNA contendo braços de homologia que flanqueiam a sequência de inserção, ou na forma de oligonucleótidos de cadeia simples (RAN *et al.*, 2013a).

Ao contrário da NHEJ, a HDR é geralmente ativa apenas em células em estado de divisão, e a sua eficácia pode variar amplamente dependendo do tipo de células e do seu estado, bem como do *locus* genómico alvo, do molde de reparação e do vetor de entrega (SALEH-GOHARI & HELLEDAY, 2004). Nesse sentido tem-se verificado que a utilização de moldes de reparação

de cadeia simples aumentam a taxa de HDR em comparação com moldes de DNA de cadeia dupla (XIAO-JIE *et al.*, 2015). De igual modo, a entrega do sistema CRISPR/Cas9 e do molde de DNA através de VAA apresenta um rácio de HDR mais elevado comparativamente a sistemas de entrega lentivirais integrase-defetivos ou a vetores não virais (HOLKERS *et al.*, 2014). O aumento da taxa de HDR é importante, uma vez que pode melhorar a eficiência e a confiabilidade da terapia génica mediada pelo sistema CRISPR-Cas9, diminuindo consequentemente possíveis efeitos genotóxicos (XIAO-JIE *et al.*, 2015).

Uma outra forma de melhorar a eficiência da HDR consiste na indução de uma mutação de substituição de aspartato por alanina (D10A) no domínio catalítico RuvC da nuclease Cas9 (GASIUNAS *et al.*, 2012; JINEK *et al.*, 2012), dando origem a uma Cas9 nickase (Cas9n). Esta nuclease mutante produz apenas quebras de cadeia simples estimulando preferencialmente a reparação por HDR (CONG *et al.*, 2013), o que ajuda a diminuir a frequência de indels indesejados resultantes de DSBs fora do alvo. A utilização de pares de sgRNA dirige a Cas9n para a clivagem simultânea das duas cadeias no locus alvo, o que aumenta ainda mais a especificidade de reconhecimento do alvo para a geração de DSBs (RAN *et al.*, 2013b).

A utilização do sistema CRISPR/Cas9 como ferramenta de reparação do genoma guiada por RNA oferece várias vantagens sobre os métodos tradicionais ZFNs e TALENs guiados por proteínas (XIAO-JIE *et al.*, 2015). O sistema CRISPR/Cas9 é capaz de melhorar significativamente a acessibilidade à sequência alvo devido à facilidade de personalização do sgRNA, revelando também uma maior eficiência de direcionamento (RAN *et al.*, 2013a) quando comparada com as ZFNs. A este respeito as TALENs apresentam uma eficiência de direcionamento comparável à do sistema CRISPR/Cas9, contudo, e à semelhança das ZFNs, esse direcionamento é mediado por proteínas, o que obriga à modificação das proteínas guia sempre que há alteração da sequência alvo (RAMALINGAM *et al.*, 2013). No caso do sistema CRISPR/Cas9 tal não se verifica, uma vez que a especificidade do alvo é conseguida por uma interação de RNA-DNA de 20 pb, que é codificada por sequências curtas de cerca de 100 pb, sendo a mesma enzima Cas9 adequada para a clivagem de qualquer sequência do genoma (RAMALINGAM *et al.*, 2013). As sgRNA do sistema/Cas9 são, portanto, mais simples e mais fáceis de projetar do que as ZFNs ou TALENs (RAMALINGAM *et al.*, 2013). O tamanho reduzido das sequências de sgRNA permite ainda evitar as dificuldades associadas com a entrega demorada e repetida de vetores contendo ZFNs ou TALENs (RAMALINGAM *et al.*, 2013). Além disso, o problema relacionado com a metilação do DNA verificado com as TALENs parece não afetar a atividade do sistema CRISPR/Cas9 (HSU *et al.*, 2013). A reparação de múltiplos locus genómicos em paralelo, devido à propriedade de *multiplexing* da CRISPR/Cas9, é

também uma vantagem importante desta ferramenta (RAN *et al.*, 2013a) que permite diferenciá-la das anteriores.

A especificidade e versatilidade da reparação génica mediada pelo sistema *CRISPR/Cas9*, juntamente com a sua facilidade de manipulação, tem conduzido ao registo de inúmeras patentes em todo mundo baseadas nesta tecnologia. Apesar de a bióloga Jennifer Doudna e a microbiologista Emmanuelle Charpentier terem sido as primeiras a descrever publicamente a tecnologia de edição *CRISPR/Cas9*, em 2012 na revista *Science* (JINEK *et al.*, 2012), a primeira patente foi registada a 15 de abril de 2014 por Feng Zhang, um cientista do Broad Institute (ZHANG, US Pat. 8697359, 2014). Desde então um sem número de patentes têm emergido, muito à custa de alterações dos componentes que constituem o sistema, principalmente da sequência do *sgRNA*, permitindo diferenciar a tecnologia através de um direcionamento específico para um determinado alvo de interesse. No seguimento do sucesso desta tecnologia têm sido também desenvolvidas empresas que disponibilizam ferramentas e bases de dados contendo informações úteis para reprodução da tecnologia em laboratório (ex. addgene, CRISPRdirect, E-CRISPR, GeCKO, Cas-OFFinder, SIGMA-ALORICH, horizon).

Aplicação do sistema *CRISPR/Cas9* na reparação génica de *iPSC*

Depois da abordagem inicial do sistema *CRISPR/Cas9* na reparação génica de linhas celulares e modelos animais (HU *et al.*, 2014; SEEGER & SOHN, 2014; WU *et al.*, 2015; YIN *et al.*, 2014), tem-se verificado, desde o início de 2013, um aumento do número de estudos que refere o sucesso da adaptação do sistema *CRISPR/CAS9* na reparação de genoma humano (CHO *et al.*, 2013; CONG *et al.*, 2013; JINEK *et al.*, 2013; MALI *et al.*, 2013b, SCHWANK *et al.*, 2013; ZHEN *et al.*, 2014).

O recurso a *iPSC* para estudar e tratar doenças genéticas incuráveis, através de inserção, deleção ou correção de genes, mediada pelo sistema *CRISPR/Cas9* tem revelado resultados muito promissores. Em 2013 o grupo de HORII *et al.* foi capaz de modificar geneticamente *iPSC* para reproduzir *in vitro* a síndrome de imunodeficiência - instabilidade centromérica - anomalias faciais, uma doença autossómica recessiva muito rara, caracterizada por dimorfismo facial, deficiência em imunoglobulina, e ramificação dos cromossomas. Esta síndrome é causada por mutações na *DNA* metiltransferase 3B (*DNMT3B*), que causam a hipometilação de repetições do satélite 2, levando à descondensação destas regiões e instabilidade centromérica, uma das principais características desta síndrome (TUCK-MULLER *et al.*, 2000). Através da utilização do sistema *CRISPR/Cas9* este grupo conseguiu obter com uma eficiência bastante elevada (63%) um modelo da doença através da geração de *iPSC* mutadas em ambos

os alelos *DNMT3B*. Estes resultados vieram demonstrar que o sistema *CRISPR/Cas9* pode ser altamente eficiente e útil para a engenharia do genoma de *iPSC* humanas (HORII *et al.*, 2013).

A abordagem de cura da β -talassémia através da combinação destas duas tecnologias também já é uma realidade. A β -talassémia é uma das doenças genéticas mais comuns em todo o mundo, e é causada por mutações no gene humano beta da hemoglobina (gene *HBB*) (XIE *et al.*, em 2014). A correção de *iPSC* derivadas de doentes com β -talassémia através da combinação da tecnologia *CRISPR/Cas9* com o sistema de transposição *PiggyBac* foi demonstrada num estudo conduzido por XIE *et al.*, em 2014. Neste estudo foi possível corrigir duas mutações diferentes causadoras de β -talassemia, restaurando a expressão do gene *HBB* em eritrócitos diferenciados a partir das *iPSC* reparadas.

De forma semelhante, um outro grupo utilizou as mesmas tecnologias para induzir mutações no gene *CCR5 Δ 32* através do processo de recombinação homóloga em *iPSC* (YE *et al.*, 2014). O recetor quimocina cisteína-cisteína tipo 5 (*CCR5*) é o principal co-recetor usado pelo vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (*HIV-1*) para infectar macrófagos, células T e outras. Tem-se verificado que indivíduos homo ou heterozigóticos para a mutação no gene *CCR5 Δ 32* apresentam, respetivamente, resistência ou uma progressão mais lenta à infeção por *HIV-1* (BERGER *et al.*, 1999; MARMOR *et al.*, 2001). Além disso, os indivíduos homozigóticos para o genótipo *CCR5 Δ 32* não demonstram aparentemente efeitos clínicos deletérios (BERGER *et al.*, 1999), o que faz do *CCR5* um alvo atraente para a terapia génica da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Neste estudo, os investigadores geraram *iPSC* homozigóticas para a mutação *CCR5 Δ 32* que foram diferenciadas posteriormente em monócitos/macrófagos. Os monócitos/macrófagos derivados destas *iPSC* demonstraram ser resistentes à infeção por *VIH-1* (YE *et al.*, 2014). Estes resultados evidenciam a importância que a aplicação destas tecnologias pode vir a ter numa possível cura da patologia no futuro.

A restauração da proteína distrofina em *iPSC* derivadas de doentes com DMD é um exemplo recente da aplicação bem sucedida da reparação génica levada a cabo pelo sistema *CRISPR/Cas9* (LI *et al.*, 2015). A DMD é uma doença degenerativa muscular grave causada por mutações no gene da distrofina localizado no cromossoma X, que leva à perda de função da proteína (LI *et al.*, 2015). Depois de restaurar a função da proteína distrofina, o grupo de LI *et al.* (2015) diferenciou as *iPSC* corrigidas em células do músculo esquelético confirmando a expressão funcional da proteína. Estes resultados fornecem um quadro importante para o desenvolvimento de terapia génica *ex vivo* baseada em *iPSC* utilizando nucleases programáveis, especialmente o sistema *CRISPR/Cas9*.

Tendo em conta a novidade, a complexidade e a especificidade técnica da aplicação clínica deste tipo de tecnologias em humanos, são necessárias regras harmonizadas e especialmente adaptadas que salvaguardem a saúde pública no que respeita à produção, distribuição e utilização de produtos utilizados em terapias avançadas (Reg. (CE) N. 1394/2007). A avaliação de medicamentos de terapia avançada exige frequentemente conhecimentos especializados muito específicos. Como tal, foi criado o Comité das Terapias Avançadas, no âmbito Agência Europeia de Medicamentos, que é responsável pela elaboração de um projeto de parecer sobre a qualidade, a segurança e a eficácia de cada medicamento de terapia avançada, para aprovação final pelo Comité dos Medicamentos para Uso Humano. Assim, além de estarem sujeitos aos mesmos princípios regulamentares que os medicamentos biotecnológicos, os requisitos técnicos, em especial o tipo e o nível de qualidade pré-clínicos e clínicos necessários para comprovar a qualidade, segurança e eficácia destes produtos, podem ser altamente específicos. A realização de ensaios clínicos deve ser realizada em conformidade com os princípios globais e requisitos éticos estabelecidos na Diretiva 2001/20/CE, respeitantes à aplicação de boas práticas clínicas na condução dos ensaios clínicos de medicamentos para uso humano. Tendo em conta as características técnicas específicas das terapias avançadas, a Diretiva 2005/28/CE, de 8 de abril de 2005 estabelece que deverão ser adaptados princípios e diretrizes pormenorizadas de boas práticas clínicas, bem como requisitos para a autorização de fabrico ou de importação desses produtos, através do estabelecimento de regras concebidas especialmente para este tipo de terapias.

Embora a maioria dos ensaios clínicos com *iPSC* se destine atualmente à produção de modelos de doença, estudo de função de genes e desenvolvimento de novas terapêuticas, a utilização de *iPSC* para transplantação autóloga em humanos já é uma realidade. Em fevereiro de 2013, Masayo Takahashi, investigadora do Centro de Biologia do Desenvolvimento, em Kobe no Japão, recebeu pela primeira vez aprovação ética das autoridades reguladoras do Japão para a realização de um ensaio clínico. O objetivo passava pelo tratamento da Degeneração Macular Relacionada com a Idade através da transplantação de *iPSC* derivadas de doentes. Depois de ter sido feita a colheita e reprogramação de células da pele de uma doente, foram apresentadas provas da segurança e estabilidade genética das *iPSC* geradas, tendo sido transplantadas, no dia 12 de setembro de 2013, sem aparecimento de efeitos colaterais graves (REARDON & CYRANOSKI, 2014). Apesar destes avanços, não existe até ao momento qualquer ensaio clínico envolvendo a tecnologia *CRISPR/Cas9* na reparação génica de *iPSC*. De facto este sistema de reparação de genoma ainda se encontra a dar os primeiros passos,

havendo um longo caminho a percorrer para garantir a segurança da aplicação desta ferramenta em terapia humana.

LIMITAÇÕES E ASPETOS A MELHORAR

A reprogramação de *iPSC* a partir de células somáticas específicas do doente e a sua correção genética através do sistema *CRISPR/Cas9* representa inevitavelmente um passo promissor para o desenvolvimento da terapia celular personalizada. Contudo a aplicação destas tecnologias em humanos ainda é vista com algumas reservas. Na origem dessas preocupações estão uma série de questões relacionadas tanto com as *iPSC* como com o sistema *CRISPR/Cas9*.

No que respeita à tecnologia de produção de *iPSC*, várias limitações têm sido enunciadas, desde baixa eficiência de reprogramação, riscos de mutagenese de inserção, reativação de transgenes ectópicos silenciados, desenvolvimento de reações imunogénicas e potencial formação de tumores (WALIA *et al.*, 2012). Estes problemas podem resultar de vários fatores. As razões para a baixa eficiência de reprogramação que se tem observado em células humanas ainda não estão bem esclarecidas, no entanto o equilíbrio entre os transgenes e/ou o nível de expressão de cada um deles parece ser um fator de influência (OKITA & YAMANAKA, 2011). Por outro lado, o uso de vetores não virais não integrativos são responsáveis por uma menor eficiência de reprogramação quando comparados com vetores virais integrativos (Tabela 1) (LI *et al.*, 2014a). Os vetores virais integrativos por seu turno estão associados ao risco de desenvolvimento de neoplasias após o transplante devido à integração dos transgenes no genoma (CHUN *et al.*, 2010). A perturbação da rede de transcrição endógena pelos transgenes inseridos pode ainda condicionar a diferenciação posterior das *iPSC*, fundamental para a aplicação destas células (CHUN *et al.*, 2010). De igual forma, a memória epigenética herdada das células somáticas de origem exerce um efeito negativo sobre o potencial de diferenciação das *iPSC*, demonstrando que a fonte a usar para gerar *iPSC* não é indiferente (KIM *et al.*, 2010). Células de diferentes linhagens celulares revelaram ter uma propensão distinta para formação de tumores após a transplantação em modelos animais, característica que parece estar também relacionada com a epigenética da célula de origem (MIURA *et al.*, 2009). A realização de biópsia para recolher as células a reprogramar, tratando-se de um processo invasivo, nem sempre é bem aceite pelo doente. Por outro lado, este procedimento condiciona a escolha do tecido celular a utilizar, pois nem todos são ideais para realizar a operação de recolha, devendo essa escolha atender à segurança, eficácia e conveniência do processo (LI *et al.*, 2014a). Além da

sua influência na posterior diferenciação das *iPSC* geradas, o tipo de célula usada é também um fator condicionante da eficiência da reprogramação inicial (BOROOAH *et al.*, 2013).

Tal como já foi referido, a reativação do fator de reprogramação *c-Myc* está na origem da formação de tumores devido às suas propriedades oncogénicas. A sua utilização levanta por isso algumas preocupações, tendo vindo a ser estudada a sua eliminação ou substituição nos protocolos de reprogramação. Outra abordagem importante tem passado pelo desenvolvimento de novas formas de entrega dos fatores de reprogramação com o intuito de eliminar a integração de transgenes no genoma por vetores virais (Anexo I - Tabela I) (CHUN *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2014a). Além das questões já mencionadas, os vetores virais estão relacionados com o aparecimento de reações imunogénicas contra as *iPSC* transplantadas em indivíduos singénicos (MIURA *et al.*, 2009). Este potencial imunogénico das *iPSC* pode ainda ser causado por fatores genéticos e epigenéticos do tecido celular do qual derivam (CAO *et al.*, 2014). A possível imunogenicidade das *iPSC* é uma questão importante dado que teoricamente umas das mais-valias desta tecnologia relaciona-se com a tolerância imunitária da transplantação autóloga de *iPSC* derivadas do doente (LI *et al.*, 2014a). Como tal, a realização de testes de imunogenicidade *in vivo* deve ser utilizada como uma plataforma de rastreio para melhorar a tecnologia de reprogramação de *iPSC* (ZHAO *et al.*, 2011).

A manutenção da integridade do genoma das *iPSC* durante a sua manipulação genética é muito importante para garantir a segurança da utilização destas células na terapia clínica (YE *et al.*, 2014). No entanto, tem-se verificado que a tecnologia de reparação génica *CRISPR/Cas9* pode estar associada ao risco de mutagénese indesejada devido à ação catalítica destas nucleases em locais fora do alvo. A frequência de mutações fora do alvo parece ser igual ou até superior às pretendidas (FU *et al.*, 2013) sendo a responsabilidade desses acontecimentos partilhada pela *Cas9* e pelo *sgRNA* (KOO *et al.*, 2015).

A ligação e clivagem mediada pela *Cas9* está absolutamente dependente do reconhecimento da sequência *PAM*, o que por si só já é uma limitação da tecnologia (YAN & WEI, 2013). Apesar disso, esta sequência é encontrada no genoma humano a cada 8-12 pb, não representando um grande inconveniente (CONG *et al.*, 2013; HSU *et al.*, 2013). Em condições normais, a *Cas9* derivada de *S. pyogenes* reconhece preferencialmente a sequência *PAM* (5'-NGG-3'). Todavia, esta nuclease pode por vezes atuar em locais com sequências *PAM* 5'-NAG-3' ou 5'-NGA-3' (HSU *et al.*, 2013) e assim originar clivagens fora do alvo (KOO *et al.*, 2015). As ruturas criadas noutras partes do genoma são normalmente reparadas pelo processo de *NHEJ* conduzindo à formação de *indels* (FU *et al.*, 2013).

O reconhecimento que medeia o emparelhamento entre o *sgRNA* e o *DNA* alvo é realizado por uma sequência específica de 20 nucleótidos. Pode acontecer, porém, que esse reconhecimento se dê em regiões sem homologia total, levando a um emparelhamento de bases errado, que em última instância conduz a clivagens fora do alvo (LIN *et al.*, 2014). Algumas dessas sequências podem conter alguns nucleótidos extra ou em falta originando, protuberâncias de *DNA* ou *RNA*, respetivamente (LIN *et al.*, 2014). Existem ainda evidências de que o emparelhamento errado entre o *sgRNA* e o seu *DNA* alvo é posição-dependente, estando a extremidade 5' da sequência guia proximal ao *PAM* mais suscetível a erros quando comparada com a região de 8-14 pb na extremidade 3' distal (HSU *et al.*, 2013). A suscetibilidade para originar erros de emparelhamento parece estar também dependente da sequência guia, sendo maior a propensão de algumas relativamente a outras (HSU *et al.*, 2013). Em geral mais de três emparelhamentos errados entre *sgRNA* e o *DNA* alvo são mal tolerados e conduzem igualmente a efeitos indesejados (HSU *et al.*, 2013). A concentração relativa de *Cas9/sgRNA* utilizada no processo de reparação é outro fator que deve ser controlado e que tem influência no aparecimento de clivagens em locais diferentes do alvo pretendido (HSU *et al.*, 2013).

Têm sido desenvolvidos vários métodos para tentar reduzir os efeitos fora do alvo. Uma forma de evitar emparelhamentos errados pelo *sgRNA*, consiste em escolher, através de previsões bioinformáticas (KOO *et al.*, 2015), um local alvo que não possua nenhuma sequência homóloga ao longo do genoma (XIAO-JIE *et al.*, 2015). Uma outra alternativa passa pela criação de *sgRNA* truncados em 2 a 3 nucleótidos, dado que sequências mais curtas possuem uma menor tolerância para erros de emparelhamento (FU *et al.*, 2014).

A utilização de nucleases *Cas9n* emparelhadas que geram quebras de cadeia simples ou cortes em diferentes cadeias de *DNA*, em vez de *DSBs*, pode aumentar significativamente a especificidade uma vez que as clivagens realizadas fora do local alvo pelas *Cas9n* podem ser fielmente reparadas por *HDR* (GHEZRAOUI *et al.*, 2014). Esta estratégia parece aumentar a especificidade para o local alvo cerca de 1500 vezes (DOUDNA & CHARPENTIER, 2014; HOU *et al.*, 2013). O uso de ortólogos da *Cas9* que reconhecem sequências *PAM* mais longas permitem melhorar a especificidade e diminuir o número de sítios de corte dentro de uma região de interesse do genoma, reduzindo assim os efeitos fora do alvo (RAN *et al.*, 2013b). A especificidade desta tecnologia pode ainda beneficiar da combinação do sistema *CRISPR/Cas9* com outras nucleases, como por exemplo a *FokI* (TSAI *et al.*, 2014).

A forma pela qual a *Cas9* e o *sgRNA* são entregues à célula é capaz de influenciar a atividade de ligação dentro e fora do alvo. Por esse motivo é essencial o desenvolvimento de

vetores de entrega mais eficientes. Os vetores VAA são os mais empregues atualmente na reparação génica devido à sua eficiência e segurança (KAUFMANN *et al.*, 2013; KOTTERMAN & SCHAFFER, 2014). Contudo, o gene que codifica para a nuclease *Cas9* derivada de *S. pyogenes* é demasiado grande para a transdução com VAA devido à carga genética limitada destes vírus. A entrega direta da proteína *Cas9* recombinante, o uso de ortólogos da *Cas9* mais pequenos derivados de outras espécies (ESVELT *et al.*, 2013), ou o aumento da carga de transporte dos VAA por métodos de engenharia genética (KOTTERMAN & SCHAFFER, 2014), representam formas viáveis para melhorar a eficiência de entrega. Neste caso a entrega mediada por peptídeos é também uma alternativa para promover uma maior atividade de ligação ao alvo quando comparada com a entrega mediada por plasmídeos (RAMAKRISHNA *et al.*, 2014). No entanto, é preciso notar que, sendo uma proteína derivada de outro organismo, a *Cas9* é suscetível de causar respostas imunológicas adversas, que poderão ser resolvidas pela supressão imunitária durante o tratamento ou, mais convenientemente, pela humanização da proteína à semelhança do que se faz em terapêuticas com anticorpos (MALI *et al.*, 2013a, RIECHMANN *et al.*, 1988).

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A recente descoberta do sistema *CRISPR/Cas9* como ferramenta para a reparação génica de *iPSC* derivadas do doente foi um enorme passo para o desenvolvimento da terapia celular personalizada. As ferramentas baseadas no sistema *CRISPR/Cas9* possuem vantagens notáveis e prometem melhorar grandemente a capacidade de reparar e regular a expressão génica em humanos. Associada à tecnologia de produção de *iPSC*, este sistema poderá ser aplicado em diversos campos biológicos, como na biotecnologia, engenharia metabólica e medicina, permitindo a realização de uma ampla gama de pesquisas. Além da sua utilidade no estudo do desenvolvimento e função dos tecidos humanos, estas tecnologias prometem também facilitar a descoberta de novos agentes terapêuticos reduzindo significativamente o tempo de desenvolvimento e os custos associados com ensaios clínicos. É importante compreender, no entanto, que existem ainda vários desafios que têm de ser resolvidos antes da aplicação na prática clínica de *iPSC* geneticamente modificadas por este método, como por exemplo o aumento da eficiência de reprogramação de *iPSC* e a eliminação de efeitos fora do alvo capazes de induzir mutagénese. Apesar de ainda se justificar a realização de estudos de segurança mais amplos, estas tecnologias prometem expandir a nossa capacidade de explorar e alterar qualquer genoma e constituem um novo e promissor paradigma para entender e tratar a doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ▶ ALKHNBASHI, O.S., COSTA, F., SHAH, S.A., GARRETT, R.A., SITA J. SAUNDERS, S.J., BACKOFEN, R. - **CRISPRstrand: predicting repeat orientations to determine the crRNA-encoding strand at CRISPR loci.** *Bioinformatics.* 30, 17 (2014), i489-i496.
- ▶ ALLEN, P.J.; FEIGIN, A. - **Gene-based therapies in Parkinson's disease.** *Neurotherapeutics.* 11, 1 (2014), 60-7.
- ▶ BERGER, E.A., MURPHY, P.M., FARBER, J.M. - **Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Roles in viral entry, tropism, and disease.** *Annu Rev Immunol.* 17, (1999), 657-700.
- ▶ BHAKTA, M.S., HENRY, I.M., OUSTEROUT, D.G., DAS, K.T., LOCKWOOD, S.H., MECKLER, J.F., WALLEN, M.C., ZYKOVICH, A., YU, Y., LEO, H., XU, L., GERSBACH, C.A., SEGAL, D.J. - **Highly active zinc-finger nucleases by extended modular assembly.** *Genome Res.* 23, 3 (2013), 530-538.
- ▶ BHAYA, D., DAVISON, M., BARRANGOU, R. - **CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation.** *Annu. Rev. Genet.* 45, (2011), 273-297.
- ▶ BOCH, J., SCHOLZE, H., SCHORNACK, S., LANDGRAF, A., HAHN, S., KAY, S., LAHAYE, T., NICKSTADT, A., BONAS, U. - **Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors.** *Science.* 326, 5959 (2009), 1509-1512.
- ▶ BOROAH, S., PHILLIPS, M.J., BILICAN, B., WRIGHT, A.F., WILMUT, I., CHANDRAN, S., GAMM, D., DHILLON B. - **Using human induced pluripotent stem cells to treat retinal disease.** *Progress in Retinal and Eye Research.* 37, (2013), 163e181.
- ▶ BRAUNWALD, E. - **The war against heart failure: the Lancet lecture.** *Lancet.* 385, 9970 (2015), 812-24.
- ▶ BRENNER, M.K., GOTTSCHALK, S., LEEN, A.M., VERA, J.F. - **Is cancer gene therapy an empty suit?.** *Lancet Oncol.* 14, 11 (2013), e447-56.
- ▶ BULTMANN, S., MORBITZER, R., SCHMIDT, C.S., THANISCH, K., SPADA, F., ELSAESSER, J., LAHAYE, T., LEONHARDT, H. - **Targeted transcriptional activation of silent oct4 pluripotency gene by combining designer TALEs and inhibition of epigenetic modifiers.** *Nucleic Acids Res.* 40, 12 (2012), 5368-5377.
- ▶ CAO, J., LI, X., LU, X., ZHANG, C., YU, H., ZHAO, T. - **Cells derived from iPSC can be immunogenic - yes or no?.** *Protein Cell.* 5, 1 (2014), 1-3.
- ▶ CARROLL, D. - **Genome engineering with zinc-finger nucleases.** *Genetics.* 188, (2011), 773-782.
- ▶ CHAMBERS, I., COLBY, D., ROBERTSON, M., NICHOLS, J., LEE, S., TWEEDIE, S., SMITH, A. - **Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells.** *Cell.* 113, 5 (2003), 643-655.
- ▶ CHANG, C.J.; BOUHASSIRA, E.E. - **Zinc-finger nuclease-mediated correction of α -thalassemia in iPS cells.** *Blood.* 120, 19 (2012), 3906-3914.
- ▶ CHARPENTIER, E.; DOUDNA, J.A. - **Biotechnology: Rewriting a genome.** *Nature.* 495, 7439 (2013), 50-51.
- ▶ CHENG, L.T., SUN, L.T., TADA, T. - **Genome editing in induced pluripotent stem cells.** *Genes to Cells.* 17, 6 (2012) 431-438.

- ▶ CHICHA, L., FEKI, A., BONI, A., IRION, O., HOVATTA, O., JACONI, M. - **Human pluripotent stem cells differentiated in fully defined medium generate hematopoietic CD34- and CD34+ progenitors with distinct characteristics.** PLoS One. 6, 2 (2011), e14733.
- ▶ CHO, S.W., KIM, S., KIM, J.M., KIM, J.S. - **Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease.** Nat. Biotechnol. 31, (2013), 230-232.
- ▶ CHOI, S.M., KIM, Y., SHIM, J.S., PARK, J.T., WANG, R.H., LEACH, S.D., LIU, J.O., DENG, C., YE, Z., JANG, Y.Y. - **Efficient drug screening and gene correction for treating liver disease using patient-specific stem cells.** Hepatology. 57, 6 (2013), 2458-2468.
- ▶ CHUN, Y.S., CHAUDHARI, P., JANG, Y.Y. - **Applications of Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells; Focused on Disease Modeling, Drug Screening and Therapeutic Potentials for Liver Disease.** International Journal of Biological Sciences. 6, 7 (2010), 796-805
- ▶ CONG, L., RAN, F.A., COX, D., LIN, S., BARRETTO, R., HABIB, N., HSU, P.D., WU, X., JIANG, W., MARRAFFINI, L.A., ZHANG, F. - **Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems.** Science. 339, 6121 (2013), 819-823.
- ▶ COWAN, C.A., ATIENZA, J., MELTON, D.A., EGGAN, K. - **Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells.** Science. 309, 5739 (2005), 1369-1373.
- ▶ CHRISTIAN, M., CERMAK, T., DOYLE, E.L., SCHMIDT, C., ZHANG, F., HUMMEL, A., BOGDANOVA, A.J., VOYTAS, D.F. - **Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases.** Genetics. 186, 2 (2010), 757-761.
- ▶ DELTCHEVA, E., CHYLINSKI, K., SHARMA, C.M., GONZALES, K., CHAO, Y., PIRZADA, Z.A., ECKERT, M.R., VOGEL, J., CHARPENTIER, E. - **CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III.** Nature. 471, 7340 (2011), 602-607.
- ▶ DIMOS, J.T., RODOLFA, K.T., NIAKAN, K.K., WEISENTHAL, L.M., MITSUMOTO, H., CHUNG, W., CROFT, G.F., SAPHIER, G., LEIBEL, R., GOLAND, R., WICHTERLE, H., CHRISTOPHER E. HENDERSON, C.E., EGGAN, K. - **Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons.** Science. 321, 5893 (2008), 1218-1221.
- ▶ DING, Q., LEE, Y.K., SCHAEFER, E.A., PETERS, D.T., VERES, A., KIM, K., KUPERWASSER, N., MOTOLA, D.L., MEISSNER, T.B., HENDRIKS, W.T., TREVISAN, M., GUPTA, R.M., MOISAN, A., BANKS, E., FRIESEN, M., SCHINZEL, R.T., XIA, F., TANG, A., XIA, Y., FIGUEROA, E., WANN, A., AHFELDT, T., DAHERON, L., ZHANG, F., RUBIN, L.L., PENG, L.F., CHUNG, R.T., MUSUNURU, K., COWAN, C.A. - **A TALEN genome-editing system for generating human stem cell- based disease models.** Cell Stem Cell. 12, 2 (2013), 238-251.
- ▶ DOUDNA, J.A.; CHARPENTIER, E. - **Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9.** Science. 346, 6213 (2014), 1258096.
- ▶ DOYON, Y., VO, T.D., MENDEL, M.C., GREENBERG, S.G., WANG, J., XIA, D.F., MILLER, J.C., URNOV, F.D., GREGORY, P.D., HOLMES, M.C. - **Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures.** Nat. Methods 8, 1 (2011), 74-79.
- ▶ ESVELT, K.M., MALI, P., BRAFF, J.L., MOOSBURNER, M., YAUNG, S.J., CHURCH, G.M. - **Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing.** Nat Methods. 10, 11 (2013), 1116-21.
- ▶ EVANS, M.J.; KAUFMAN, M.H. - **Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.** Nature. 292, 5819 (1981), 154-156.

- ▶ FINOTTI, A., BREDA, L., LEDERER, C.W., BIANCHI, N., ZUCCATO, C., KLEANTHOUS, M., RIVELLA, S., GAMBARI, R. - **Recent trends in the gene therapy of β -thalassemia**. *Journal of Blood Medicine*. 6, (2015), 69-85.
- ▶ FU, Y., FODEN, J.A., KHAYTER, C., MAEDER, M.L., REYON, D., JOUNG, J.K., SANDER, J.D. - **High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells**. *Nat. Biotechnol.* 31, 9 (2013), 822-826.
- ▶ FU, Y., SANDER, J.D., REYON, D., CASCIO, V.M., JOUNG, J.K. - **Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs**. *Nat Biotechnol.* 32, 3 (2014), 279-84.
- ▶ FUSAKI, N., BAN, H., NISHIYAMA, A., SAEKI, K., HASEGAWA, M. - **Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome**. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 85, 8 (2009), 348-362.
- ▶ GABRIEL, R., LOMBARDO, A., ARENS, A., MILLER, J.C., GENOVESE, P., KAEPPPEL, C., NOWROUZI, A., BARTHOLOMAE, C.C., WANG, J., FRIEDMAN, G., HOLMES, M.C., GREGORY, P.D., GLIMM, H., SCHMIDT, M., NALDINI, L., VON KALLE, C. - **An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity**. *Nat. Biotechnol.* 29, 9 (2011), 816-823.
- ▶ GASIUNAS, G., BARRANGOU, R., HORVATH, P., SIKSNYS, V. - **Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 39 (2012), E2579-86.
- ▶ GERACE, D., MARTINIELLO-WILKS, R., O'BRIEN, B.A., SIMPSON, A.M. - **The use of β -cell transcription factors in engineering artificial β cells from non-pancreatic tissue**. *Gene Ther.* 22, 1 (2015), 1-8.
- ▶ GHEZRAOUI, H., PIGANEAU, M., RENOUF, B., RENAUD, J.B., SALLMYR, A., RUIS, B., OH, S., TOMKINSON, A.E., HENDRICKSON, E.A., GIOVANNANGELI, C., JASIN, M., BRUNET, E. - **Chromosomal Translocations in Human Cells Are Generated by Canonical Nonhomologous End-Joining**. *Mol Cell.* 55, 6 (2014), 829-42.
- ▶ GOULD, J. - **Gene therapy: genie in a vector**. *Nature.* 515, S (2014), 160-1.
- ▶ GRISSA, I., VERGNAUD, G., POURCEL, C. - **The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats**. *BMC Bioinformatics.* 8, 172 (2007), 1-10.
- ▶ HANNA, J., WERNIG, M., MARKOULAKI, S., SUN, C.W., MEISSNER, A., CASSADY, J.P., BEARD, C., BRAMBRINK, T., WU, L.C., TOWNES, T.M., JAENISCH, R. - **Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPSC cells generated from autologous skin**. *Science.* 318, 5858 (2007), 1920-3.
- ▶ HARRISON, M.M., BRIAN V. JENKINS, B.V., O'CONNOR-GILES, K.M., WILDONGER, J. - **A CRISPR view of development**. *Genes & Development.* 28, 17 (2014), 1859-1872.
- ▶ HARUTA, M., TOMITA, Y., YUNO, A., MATSUMURA, K., IKEDA, T., TAKAMATSU, K., HAGA, E., KOBAYASHI, C., NISHIMURA, Y., SENJU, S. - **TAP-deficient human iPSC cell-derived myeloid cell lines as unlimited cell source for dendritic cell-like antigen-presenting cells**. *Gene Ther.* 20, 5 (2013), 504-513.
- ▶ HOCKEMEYER, D., WANG, H., KIANI, S., LAI, C.S., GAO, Q., CASSADY, J.P., COST, G.J., ZHANG, L., SANTIAGO, Y., MILLER, J.C., ZEITLER, B., CHERONE, J.M., MENG, X., HINKLEY, S.J., REBAR, E.J., GREGORY, P.D., URNOV, F.D., JAENISCH, R. - **Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases**. *Nat. Biotechnol.* 29, 8 (2011), 731-734.

-
- ▶ HOLKERS M, MAGGIO I, HENRIQUES SF, JANSSEN JM, CATHOMEN T, GONÇALVES MA. - **Adenoviral vector DNA for accurate genome editing with engineered nucleases.** Nat Methods. 11, 10 (2014), 1051-7.
 - ▶ HORII, T., TAMURA, D., MORITA, S., KIMURA, M., HATADA, I. - **Generation of an ICF Syndrome Model by Efficient Genome Editing of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using the CRISPR System.** Int. J. Mol. Sci. 14, 10 (2013), 19774-19781.
 - ▶ HORVATH, P., ROMERO, D.A. CÔUTÉ-MONVOISIN, A.C., RICHARDS, M., DEVEAU, H., MOINEAU, S., BOYAVAL, P., FREMAUX, C., BARRANGOU, R. - **Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in Streptococcus thermophilus.** J. Bacteriol. 190, 4 (2008), 1401-1412.
 - ▶ HOU, Z., ZHANG, Y., PROPSON, N.E., HOWDEN, S.E., CHU, L.F., SONTHEIMERB, E.J., THOMSON, J.A. - **Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from Neisseria meningitidis.** Proc Natl Acad Sci. 110, 39 (2013), 15644-15649.
 - ▶ HSU, P.D.; ZHANG, F. - **Dissecting neural function using targeted genome engineering technologies.** ACS Chem. Neurosci. 3, 8 (2012), 603-610.
 - ▶ HSU, P.D., SCOTT, D.A., WEINSTEIN, J.A., RAN, F.A., KONERMANN, S., AGARWALA, V., LI, Y., FINE, E.J., WU, X., SHALEM, O., CRADICK, T.J., MARRAFFINI, L.A., BAO, G., ZHANG, F. - **DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases.** Nat Biotechnol. 31, 9 (2013), 827-832.
 - ▶ HU, K. (2014a) - **All Roads Lead to Induced Pluripotent Stem Cells: The Technologies of iPSC Generation.** Stem Cells and Development. 23, 12 (2014), 1285-1300.
 - ▶ HU, K. (2014b) - **Vectorology and Factor Delivery in Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming.** Stem Cells and Development. 23, 12 (2014), 1308-1309.
 - ▶ HU, W., KAMINSKI, R., YANG, F., ZHANG, Y., COSENTINO, L., LI, F., LUO, B., ALVAREZ-CARBONELL, D., GARCIA-MESA, Y., KRNA, J., MO, X., KHALILI, K. - **RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection.** Proc Natl Acad Sci USA. 111, 31 (2014), 1461-1466.
 - ▶ IMAIZUMI, Y.; OKANO, H. - **Modeling human neurological disorders with induced pluripotent stem cells.** Journal of Neurochemistry. 129, 3 (2014), 388-399.
 - ▶ JANSEN, R., VAN EMBDEN, J.D., GAASTRA, W., SCHOOLS, L.M. - **Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes.** OMICS. 6, 1 (2002), 23-33.
 - ▶ JINEK, M., CHYLINSKI, K., FONFARA, I., HAUER, M., DOUDNA, J.A., CHARPENTIER, E. - **A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.** Science. 337, 6096 (2012), 816-821.
 - ▶ JINEK, M. EAST, A., CHENG, A., LIN, S., MA, E., DOUDNA, J. - **RNA-programmed genome editing in human cells.** eLife. 2, e00471 (2013), 1-9.
 - ▶ JOUNG, J.K.; SANDER, J.D. - **TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing.** Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 14, 1 (2013), 49-55.
 - ▶ KARVELIS, T., GASIUNAS, G., MIKSYS, A., BARRANGOU, R., HORVATH, P., SIKSNYS, V. - **crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in Streptococcus thermophiles.** RNA Biology. 10, 5 (2013), 841-851.
 - ▶ KAUFMANN, K.B., BÜNING, H., GALY, A., SCHAMBACH, A., GREZ, M. - **Gene therapy on the move.** EMBO Mol Med. 5, 11 (2013), 1642-1661.
-

- ▶ KIM, H.; KIM, J.S. - **A guide to genome engineering with programmable nucleases**. *Nat Rev Genet.* 15, 5 (2014), 321-34.
- ▶ KIM, J., CHU, J., SHEN, X., WANG, J., ORKIN, S.H. - **An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells**. *Cell.* 132, 6 (2008), 1049-1061.
- ▶ KIM, K., DOI, A., WEN, B., NG, K., ZHAO, R., CAHAN, P., KIM, J., ARYEE, M.J., JI, H., EHRLICH, L., YABUUCHI, A., TAKEUCHI, A., CUNNIFF, K.C., HONGGUANG, H., MCKINNEY-FREEMAN, S., NAVEIRAS, O., YOON, T.J., IRIZARRY, R.A., JUNG, N., SEITA, J., HANNA, J., MURAKAMI, P., JAENISCH, R., WEISSELER, R., ORKIN, S.H., WEISSMAN, I.L., FEINBERG, A.P., DALEY, G.Q. - **Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells**. *Nature.* 467, 7313 (2010), 285-290.
- ▶ KNOEPFLER, P.S., ZHANG, X.Y., CHENG, P.F., GAFKEN, P.R., MCMAHON, S.B., EISENMAN, R.N. - **Myc influences global chromatin structure**. *EMBO J.* 25, 12 (2006), 2723-2734.
- ▶ KOBAYASHI, T., YAMAGUCHI, T., HAMANAKA, S., KATO-ITOH, M., YAMAZAKI, Y., IBATA, M., SATO, H., LEE, Y.S., USUI, J., KNISELY, A.S., HIRABAYASHI, M., NAKAUCHI, H. - **Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells**. *Cell.* 2010, 142, 5 (2010), 787-799.
- ▶ KOO, T., LEE, J., KIM, J.S. - **Measuring and Reducing Off-Target Activities of Programmable Nucleases Including CRISPR-Cas9**. *Mol. Cells.* 38, 6 (2015), 475-481.
- ▶ KOTTERMAN, M.A.; SCHAFFER, D.V. - **Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy**. *Nat Rev Genet.* 15, 7 (2014), 445-51.
- ▶ KUMAR, D., TALLURI, T.R., ANAND, T., KUES, W.A. - **Induced pluripotent stem cells: Mechanisms, achievements and perspectives in farm animals**. *World J Stem Cells.* 7, 2 (2015), 315-328.
- ▶ LI, H.L., FUJIMOTO, N., SASAKAWA, N., SHIRAI, S., OHKAME, T., SAKUMA, T., TANAKA, M., AMANO, N., WATANABE, A., SAKURAI, H., YAMAMOTO, T., YAMANAKA, S., HOTTA, A. - **Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9**. *Stem Cell Reports.* 4, 1 (2015), 143-154.
- ▶ LI, J., SONG, W., PAN, G., ZHOU, J. (2014a) - **Advances in understanding the cell types and approaches used for generating induced pluripotent stem cells**. *Journal of Hematology & Oncology.* 7, 50 (2014), 1-18.
- ▶ LI, M., SUZUKI, K., KIM, N.Y., LIU, G.H., BELMONTE, J.C. (2014b) - **A Cut above the Rest: Targeted Genome Editing Technologies in Human Pluripotent Stem Cells**. *The Journal of Biological Chemistry.* 289, 8 (2014), 4594-4599.
- ▶ LI, Y., MCCLINTICK, J., ZHONG, L., EDENBERG, H.J., YODER, M.C., CHAN, R.J. - **Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4**. *Blood.* 105, 2 (2005), 635-637.
- ▶ LIANG, P.; DU, J. - **Human induced pluripotent stem cell for modeling cardiovascular diseases**. *Regenerative Medicine Research.* 2, (2014), 4.
- ▶ LILLESTØL, R.K., REDDER, P., GARRETT, R.A., BRUGGER, K. - **A putative viral defence mechanism in archaeal cells**. *Archaea.* 2, 1 (2006), 59-72.
- ▶ LIN, Y., CRADICK, T.J., BROWN, M.T., DESHMUKH, H., RANJAN, P., SARODE, N., WILE, B.M., VERTINO, P.M., STEWART, F.J. AND BAO, G. - **CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions**

- or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 42, (2014), 7473-7485.
- ▶ LO, B.; PARHAM, L. - **Ethical issues in stem cell research.** *Endocr. Rev.* 30, 3 (2009), 204-213.
 - ▶ Ma, N., Liao, B., Zhang, H., Wang, L., Shan, Y., Xue, Y., Huang, K., Chen, S., Zhou, X., Chen, Y., Pei, D., Pan, G. - **Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated gene correction in integration-free beta-thalassemia induced pluripotent stem cells.** *J Biol Chem.* 288, 48 (2013), 34671-34679.
 - ▶ MAEKAWA, M., YAMAGUCHI, K., NAKAMURA, T., SHIBUKAWA, R., KODANAKA, I., ICHISAKA, T., KAWAMURA, Y., MOCHIZUKI, H., GOSHIMA, N., YAMANAKA, S. - **Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1.** *Nature.* 474, 7350 (2011), 225-229.
 - ▶ MAETZEL, D., SARKAR, S., WANG, H., ABI-MOSLEH, L., XU, P., CHENG, A.W., GAO, Q., MITALIPOVA, M., JAENISCH, R. - **Genetic and chemical correction of cholesterol accumulation and impaired autophagy in hepatic and neural cells derived from Niemann-Pick Type C patient-specific iPSC cells.** *Stem Cell Rep.* 2, 6 (2014), 866-880.
 - ▶ MALI, P., ESVELT, K.M., CHURCH, G.M. (2013a) - **Cas9 as a versatile tool for engineering biology.** *Nat Methods.* 10, 10 (2013), 957-963.
 - ▶ MALI, P., YANG, L., ESVELT, K.M., AACH, J., GUELL, M., DICARLO, J.E., NORVILLE, J.E., CHURCH, G.M. (2013b) - **RNA-guided human genome engineering via Cas9.** *Science.* 339, 6121 (2013), 823-826.
 - ▶ MANJUNATH, N., YI, G., DANG, Y., SHANKAR, P. - **Newer gene editing technologies toward HIV gene therapy.** *Viruses.* 5, 11 (2013), 2748-66.
 - ▶ MAKAROVA, K.S., HAFT, D.H., BARRANGOU, R., BROUNS, S.J., CHARPENTIER, E., HORVATH, P., MOINEAU, S., MOJICA, F.J., WOLF, Y.I., YAKUNIN, A.F., VAN DER OOST, J., KOONIN, E.V. - **Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems.** *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 6 (2011), 467-477.
 - ▶ MARMOR, M., HAYNES W.S., DONNELL, D., BOZEMAN, S., CELUM, C., BUCHBINDER, S., KOBLIN, B., SEAGE, G.R. - **Homozygous and heterozygous CCR5-Delta32 genotypes are associated with resistance to HIV infection.** *J Acquir Immune Defic Syndr.* 27, 5 (2001), 472-481.
 - ▶ MARRAFFINI, L.A.; SONTHEIMER, E.J. - **CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea.** *Nat. Rev. Genet.* 11, 3 (2010), 181-190.
 - ▶ MASUI, S., NAKATAKE, Y., TOYOOKA, Y., SHIMOSATO, D., YAGI, R., TAKAHASHI, K., OKOCHI, H., OKUDA, A., MATOBA, R., SHAROV, A.A., KO, M.S., NIWA, H. - **Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells.** *Nat Cell Biol.* 9, 6 (2007), 625-635.
 - ▶ MESHORER, E., YELLAJOSHULA, D., GEORGE, E., SCAMBLER, P.J., BROWN, D.T., AND MISTELI, T. - **Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells.** *Dev. Cell.* 10, 1 (2006), 105-116.
 - ▶ MILLER, J.C., HOLMES, M.C., WANG, J., GUSCHIN, D.Y., LEE, Y.L., RUPNIEWSKI, I., BEAUSEJOUR, C.M., WAITE, A.J., WANG, N.S., KIM, K.A., GREGORY, P.D., PABO, C.O., REBAR, E.J. - **An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing.** *Nat. Biotechnol.* 25, 7 (2007) 778-785.

- ▶ MIURA, K., OKADA, Y., AOI, T., OKADA, A., TAKAHASHI, K., OKITA, K., NAKAGAWA, M., KOYANAGI, M., TANABE, K., OHNUKI, M., OGAWA, D., IKEDA, E., OKANO, H., YAMANAKA, S. - **Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines.** *Nat Biotechnol.* 27, 8 (2009), 743-45.
- ▶ MIYAMOTO, K., TSUKIYAMA, T., YANG, Y., LI, N., MINAMI, N., YAMADA, M., IMAI, H. - **Cell-free extracts from mammalian oocytes partially induce nuclear reprogramming in somatic cells.** *Biol Reprod.* 80, 5 (2009), 935-943.
- ▶ MIYOSHI, N., ISHII, H., NAGANO, H., HARAGUCHI, N., DEWI, D.L., KANO, Y., NISHIKAWA, S., TANEMURA, M., MIMORI, K., TANAKA, F., SAITO, T., NISHIMURA, J., TAKEMASA, I., MIZUSHIMA, T., IKEDA, M., YAMAMOTO, H., SEKIMOTO, M., DOKI, Y., MORI, M. - **Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs.** *Cell Stem Cell.* 8, 6 (2011), 633-638.
- ▶ MORRÓ, M., TEICHENNE, J., JIMENEZ, V., KRATZER, R., MARLETTA, S., MAGGIONI, L., MALLOL, C., RUBERTE, J., KOCHANNEK, S., BOSCH, F., AYUSO, E. - **Pancreatic transduction by helper-dependent adenoviral vectors via intraductal delivery.** *Hum Gene Ther.* 25, 9 (2014), 824-36.
- ▶ MOSCOU, M.J.; BOGDANOVA, A.J. - **A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors.** *Science.* 326, 5959 (2009), 1501.
- ▶ NAKAGAWA, M., KOYANAGI, M., TANABE, K., TAKAHASHI, K., ICHISAKA, T., AOI, T., OKITA, K., MOCHIDUKI, Y., TAKIZAWA, N., YAMANAKA, S. - **Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts.** *Nat Biotechnol.*; 26, 1 (2008), 101-6.
- ▶ NAKATAKE, Y., FUKUI, N., IWAMATSU, Y., MASUI, S., TAKAHASHI, K., YAGI, R., YAGI, K., MIYAZAKI, J., MATOBA, R., KO, M.S., NIWA, H. - **Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells.** *Mol. Cell. Biol.* 26, 20 (2006), 7772-7782.
- ▶ NIWA, H., OGAWA, K., SHIMOSATO, D., ADACHI, K. - **A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells.** *Nature.* 460, 7251 (2009), 118-122.
- ▶ OSBORN, M.J., STARKER, C.G., MCELROY, A.N., WEBBER, B.R., RIDDLE, M.J., XIA, L., DEFEO, A.P., GABRIEL, R., SCHMIDT, M., VON KALLE, C., DANIEL F CARLSON, D.F., MAEDER, M.L., JOUNG, J.K., WAGNER, J.E., VOYTAS, D.F., BRUCE R BLAZAR, B.R., TOLAR, J. - **TALLEN-based gene correction for epidermolysis bullosa.** *Mol. Ther.* 21, 6 (2013), 1151-1159.
- ▶ OKITA, K., ICHISAKA, T., YAMANAKA, S. - **Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells.** *Nature.* 448, (2007), 318-24.
- ▶ OKITA, K.; YAMANAKA, S. - **Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 366, 1575 (2011), 2198-2207.
- ▶ PATTANAYAK, V., RAMIREZ, C.L., JOUNG, J.K. & LIU, D.R. - **Revealing off-target cleavage specificities of zincfinger nucleases by in vitro selection.** *Nat. Methods.* 8, 9 (2011), 765-770.
- ▶ PEREZ, E.E., WANG, J., MILLER, J.C., JOUVENOT, Y., KIM, K.A., LIU, O., WANG, N., LEE, G., BARTSEVICH, V.V., LEE, Y.L., GUSCHIN, D.Y., RUPNIEWSKI, I., WAITE, A.J., CARPENITO, C., CARROLL, R.G., ORANGE, J.S., URNOV, F.D., REBAR, E.J., ANDO, D., GREGORY, P.D., RILEY, J.L., HOLMES, M.C., JUNE, C.H. - **Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases.** *Nat. Biotechnol.* 26, 7 (2008), 808-816.
- ▶ PUL, Ü., WURM, R., ARSLAN, Z., GEISSEN, R., HOFMANN, N., WAGNER, R. - **Identification and characterization of E. coli CRISPR-cas promoters and their silencing by H-NS.** *Mol. Microbiol.* 75, 6 (2010), 1495-1512.

-
- ▶ QIU, C., MA, Y., WANG, J., PENG, S., HUANG, Y. - **Lin28-mediated posttranscriptional regulation of Oct4 expression in human embryonic stem cells.** *Nucleic Acids Res.* 38, 4 (2010), 1240-1248.
 - ▶ RAMAKRISHNA, S., KWAKU, DAD, A.B., BELOOR, J., GOPALAPPA, R., LEE, S.K., KIM, H. - **Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA.** *Genome Res.* 24, 6 (2014), 1020-7.
 - ▶ RAMALINGAM, S., ANNALURU, N., CHANDRASEGARAN, S. - **A CRISPR way to engineer the human genome.** *Genome Biology.* 14, 107 (2013), 1-4.
 - ▶ RAN, F.A., HSU, P.D., WRIGHT, J., AGARWALA, V., SCOTT, D.A., ZHANG, F. (2013a) - **Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system.** *Nature Protocols.* 8, 11 (2013), 2281-308.
 - ▶ RAN, F.A., HSU, P.D., LIN, C.Y., GOOTENBERG, J.S., KONERMANN, S., TREVINO, A.E., SCOTT, D.A., INOUE, A., MATOBA, S., ZHANG, Y., ZHANG, F. (2013b) - **Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity.** *Cell.* 154, 6 (2013), 1380-1389.
 - ▶ RAO, M.S.; MALIK, N. - **Assessing iPSC Reprogramming Methods for Their Suitability in Translational Medicine.** *Cell Biochem.* 113, 10 (2012), 3061-3068.
 - ▶ RATAJCZAK, M.Z., ZUBA-SURMA, E.K., WYSOCZYNSKI, M., WAN, W., RATAJCZAK, J., KUCIA, M. - **Hunt for Pluripotent Stem Cell – Regenerative Medicine Search for Almighty Cell.** *J Autoimmun.* 30, 3 (2008), 151-162.
 - ▶ REARDON, S.; CYRANOSKI, D. - **Japan stem-cell trial stirs envy - Researchers elsewhere can't wait to test iPSC cells in humans.** *Nature.* 513, (2014), 287-288.
 - ▶ RICHTER, C., CHANG, J.T., FINERAN, P.C. - **Function and Regulation of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / CRISPR Associated (Cas) Systems.** *Viruses.* 4, 10 (2012), 2291-2311.
 - ▶ RIECHMANN, L., CLARK, M., WALDMANN, H., WINTER, G. - **Reshaping human antibodies for therapy.** *Nature.* 332, 6162 (1988), 323-327.
 - ▶ ROWLAND, B.D., BERNARDS, R., PEEPER, D.S. - **The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene.** *Nat. Cell Biol.* 7, 11 (2005) 1074-1082.
 - ▶ SALEH-GOHARI, N.; HELLEDAY, T. - **Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells.** *Nucleic Acids Res.* 32, 12 (2004), 3683-3688.
 - ▶ SAPRANAUSKAS, R., GASIUNAS, G., FREMAUX, C., BARRANGOU, R., HORVATH, P., SIKSNYS, V. - **The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli.** *Nucleic Acids Res.* 39, 21 (2011), 9275-9282.
 - ▶ SCHWANK, G., KOO, B.K., SASSELLI, V., DEKKERS, J.F., HEO, I., DEMIRCAN, T., SASAKI, N., BOYMANS, S., CUPPEN, E., VAN DER ENT, C.K., NIEUWENHUIS, E.E., BEEKMAN, J.M., CLEVERS, H. - **Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients.** *Cell Stem Cell.* 13, 6 (2013), 653-658.
 - ▶ SINGH, P., SCHIMENTI, J.C., BOLCUN-FILAS, E. - **A Mouse Geneticist's Practical Guide to CRISPR Applications.** *Genetics.* 199, 1 (2015), 1-15.
 - ▶ SEEGER, C., SOHN, J.A. - **Targeting Hepatitis B Virus With CRISPR/Cas9.** *Mol Ther Nucleic Acids.* 3, (2014), e216.
-

-
- ▶ SINKUNAS, T., GASIUNAS, G., WAGHMARE, S.P., DICKMAN, M.J., BARRANGOU, R., HORVATH, P., SIKSNYS, V. - **In vitro reconstitution of Cascade-mediated CRISPR immunity in *Streptococcus thermophilus***. EMBO J. 32, 3 (2013), 385-394.
 - ▶ SONG, Z., CAI, J., LIU, Y., ZHAO, D., YONG, J., DUO, S., SONG, X., GUO, Y., ZHAO, Y., QIN, H., YIN, X., WU, C., CHE, J., LU, S., DING, M., DENG, H. - **Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells**. Cell Res. 19, 11 (2009), 1233-1242.
 - ▶ SPENCE, J.R., MAYHEW, C.N., RANKIN, S.A., KUCHAR, M.F., VALLANCE, J.E., TOLLE, K. HOSKINS, E.E., KALINICHENKO, V.V., WELLS, S.I., ZORN, A.M., SHROYER, N.F., WELLS, J.M. - **Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro**. Nature, 470, 7332 (2010), 105-109.
 - ▶ STADTFELD, M., NAGAYA, M., UTIKAL, J., WEIR, G., HOCHEDLINGER, K. - **Induced pluripotent stem cells generated without viral integration**. Science. 322, 5903 (2008) 945-9.
 - ▶ SWIJNENBURG, R.J., SCHREPFER, S., GOVAERT, J.A., CAO, F., RANSOHOFF, K., SHEIKH, A.Y., HADDAD, M., CONNOLLY, A.J., DAVIS, M.M., ROBBINS, R.C., WU, J.C. - **Immunosuppressive therapy mitigates immunological rejection of human embryonic stem cell xenografts**. Proc Natl Acad Sci USA. 105, 35 (2008), 12991-12996.
 - ▶ SYMINGTON, L.S.; GAUTIER, J. - **Double-strand break end resection and repair pathway choice**. Annu. Rev. Genet. 45, (2011), 247-271.
 - ▶ TADA, M., TAKAHAMA, Y., ABE, K., NAKATSUJI, N., TADA, T. - **Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells**. Curr Biol. 11, 19 (2001), 1553-1558
 - ▶ TAKAHASHI, K., TANABE, K., OHNUKI, M., NARITA, M., ICHISAKA, T., TOMODA, K., YAMANAKA, S. - **Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors**. Cell. 131, 5 (2007) 861-872.
 - ▶ TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. - **Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors**. Cell. 126, 4 (2006), 663-676.
 - ▶ TERNS, M.P.; TERNS, R.M. - **CRISPR-based adaptive immune systems**. Curr. Opin. Microbiol. 14, 3 (2011), 321-327.
 - ▶ THOMSON, J.A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S.S., WAKNITZ, M.A., SWIERGIEL, J.J., MARSHALL, V.S., JONES, J.M. - **Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts**. Science. 282, 5391(1998), 1145-1147
 - ▶ TSAI, S.Q., WYVEKENS, N., KHAYTER, C., FODEN, J.A., THAPAR, V., REYON, D., GOODWIN, M.J., ARYEE, M.J., JOUNG, J.K. - **Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing**. Nat Biotechnol. 32, 6 (2014), 569-76.
 - ▶ TUCK-MULLER, C.M., NARAYAN, A., TSIEN, F., SMEETS, D.F., SAWYER, J., FIALA, E.S., SOHN, O.S., EHRLICH, M. - **DNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients**. Cytogenet. Cell Genet. 89, 1-2 (2000), 121-128.
 - ▶ URNOV, F.D., REBAR, E.J., HOLMES, M.C., ZHANG, H.S., GREGORY, P.D. - **Genome editing with engineered zinc finger nucleases**. Nat. Rev. Genet. 11, 9 (2010), 636-646.
 - ▶ VALTON, J., DUPUY, A., DABOUSSI, F., THOMAS, S., MARÉCHAL, A., MACMASTER, R., MELLIAND, K., JUILLERAT, A., DUCHATEAU, P. - **Overcoming transcription activator-like effector (TALE) DNA binding domain sensitivity to cytosine methylation**. J. Biol. Chem. 287, 46 (2012), 38427-38432.
-

- ▶ WALIA, B., SATIJA, N., TRIPATHI, R.P., GANGENAHALLI, G.U. - **Induced pluripotent stem cells: fundamentals and applications of the reprogramming process and its ramifications on regenerative medicine.** Stem Cell Rev. 8, 1 (2012) 100-115.
- ▶ WILMUT, I., SCHNIEKE, A.E., MCWHIR, J., KIND, A.J., AND CAMPBELL, K.H. - **Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells.** Cloning Stem Cells. 9, 1 (2007), 3-7.
- ▶ WU, Y., ZHOU, H., FAN, X., ZHANG, Y., ZHANG, M., WANG, Y., XIE, Z., BAI, M., YIN, Q., LIANG, D., TANG, W., LIAO, J., ZHOU, C., LIU, W., ZHU, P., GUO, H., PAN, H., WU, C., SHI, H., WU, L., TANG, F., LI, J. - **Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells.** Cell Res. 25, 1 (2015), 67-79.
- ▶ XIAO-JIE, L., HUI-YING, X., ZUN-PING, K., JIN-LIAN, C., LI-JUAN, J. - **CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy.** J Med Genet. 52, 5 (2015) 289-296.
- ▶ XIE, F., YE, L., CHANG, J.C., BEYER, A.I., WANG, J., MUENCH, M.O., KAN, Y.W. - **Seamless gene correction of beta-thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac.** Genome Res. 24, 9 (2014), 1526-1533.
- ▶ XU, T., LI, Y., VAN NOSTRAND, J.D., HE, Z., ZHOU, J. - **Cas9-Based Tools for Targeted Genome Editing and Transcriptional Control.** Appl. Environ. Microbiol. 80, 5 (2014), 1544-1552.
- ▶ XU, Y.N., GUAN, N., WANG, Z.D., SHAN, Z.Y., SHEN, J.L., ZHANG, Q.H., JIN, L.H., LEI, L. - **ES cell extract-induced expression of pluripotent factors in somatic cells.** Anat Rec (Hoboken). 292, 8 (2009), 1229-1234.
- ▶ YAMANAKA, S. - **Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells.** Cell Stem Cell. 1, 1 (2007) 39-49.
- ▶ YAN, Y.; WEI, D. - **The CRISPR-Cas9 System: A Powerful Tool for Genome Engineering and Regulation.** Adv Genet Eng. 2, 3 (2013), 1-3.
- ▶ YE, L., WANG, J., BEYER, A.I., TEQUE, F., CRADICK, T.J., QI, Z., CHANG, J.C., BAO, G., MUENCH, M.O., YU, J. LEVYD, J.A., KAN, Y.W. - **Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5Delta32 mutation confers resistance to HIV infection.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.. 111, (2014), 9591-9596.
- ▶ YIN, H., XUE, W., CHEN, S., BOGORAD, R.L., BENEDETTI, E., GROMPE, M., KOTELIANSKY, V., SHARP, P.A., JACKS, T., ANDERSON, D.G. - **Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype.** Nat Biotechnol. 32, 6 (2014), 551-3.
- ▶ YING, Q.L., NICHOLS, J., EVANS, E.P., SMITH, A.G. - **Changing potency by spontaneous fusion.** Nature. 416, 6880 (2002), 545-548.
- ▶ YOSEF, I., GOREN, M.G., QIMRON, U. - **Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in Escherichia coli.** Nucleic Acids Res. 40, 12 (2012), 5569-5576.
- ▶ YOSHIDA, Y.; YAMANAKA, S. - **Recent Stem Cell Advances: Induced Pluripotent Stem Cells for Disease Modeling and Stem Cell-Based Regeneration.** American Heart Association, Inc. 122, 1 (2010), 80-87.
- ▶ YU, J., VODYANIK, M.A., SMUGA-OTTO, K., ANTOSIEWICZ-BOURGET, J., FRANE, J.L., TIAN, S., NIE, J., JONSDOTTIR, G.A., RUOTTI, V., STEWART, R., SLUKVIN, I.I., THOMSON, J.A. - **Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells.** Science, 318, 5858 (2007), 1917-1920.

- ▶ YUSA, K., RASHID, S.T., STRICK-MARCHAND, H., VARELA, I., PEI-QI LIU, P.Q., PASCHON, D.E., MIRANDA, E., ORDÓÑEZ, A., HANNAN, N.R., ROUHANI, F.J., DARCHE, S., ALEXANDER, G., MARCINIAK, S.J., FUSAKI, N., HASEGAWA, M., HOLMES, M.C., DI SANTO, J.P., LOMAS, D.A., BRADLEY, A., VALLIER, L. - **Targeted gene correction of α 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells**. *Nature*. 478, 7369 (2011), 391-394.
- ▶ WANG, X., DAI, J. - **Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology**. *Stem Cells*. 28, 5 (2010), 885-893.
- ▶ ZHANG, D., JIANG, W., LIU, M., SUI, X., YIN, X., CHEN, S., SHI, Y., DENG, H. - **Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells**. *Cell Res*. 19, 4 (2009), 429-438.
- ▶ ZHANG, F. - **CRISPR-Cas systems and methods for altering expression of gene products**. US Pat. 8697359, 2014. [Acedido a 21 Junho de 2015]. Disponível na internet: https://www.google.pt/patents/US8697359?dq=CRISPR&hl=pt-PT&sa=X&ei=gnuRVd_IGsT_UqjUrpAL&ved=0CB4Q6AEwAA#backward-citations
- ▶ ZHANG, J., ROUILLON, C., KEROU, M., REEKS, J., BRUGGER, K., GRAHAM, S., REIMANN, J., CANNONE, G., LIU, H., ALBERS, S.V., NAISMITH, J.H., SPAGNOLO, L., WHITE, M.F. - **Structure and mechanism of the CMR complex for CRISPRmediated antiviral immunity**. *Mol. Cell*. 45, 3 (2012), 303-313.
- ▶ ZHAO, T., ZHANG, Z.N., RONG, Z., XU, Y. - **Immunogenicity of induced pluripotent stem cells**. *Nature*. 474, (2011), 212-215.
- ▶ ZHEN, S., HUA, L., TAKAHASHI, Y., NARITA, S., LIU, Y.H., LI, Y. - **In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus I6-positive cervical cancer cells by CRISPR/Cas9**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 450, 4 (2014), 1422-1426.
- ▶ ZHOU, Y.Y.; ZENG, F. - **Integration-free Methods for Generating Induced Pluripotent Stem Cells**. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 11, 5 (2013), 284-287.

LEGISLAÇÃO

- ▶ **Diretiva 2001/20/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 4 de Abril de 2001**. (Diretiva alterada pelo regulamento (CE) N. 1901/2006).
- ▶ **Diretiva 2005/28/CE da Comissão de 8 de Abril de 2005**.
- ▶ **Regulamento (CE) N. 1394/2007 do Parlamento Europeu e do Conselho de 13 de Novembro de 2007** relativo a medicamentos de terapia avançada e que altera a diretiva 2001/83/CE e o Regulamento (CE) N. 726/2004. (alterado pelo regulamento (UE) N. 1235/2010 do parlamento europeu e do conselho de 15 de Dezembro de 2010).

ANEXOS

ANEXO I

Tabela I - Comparação dos vários métodos de reprogramação usados na produção de iPSC.

Método	Vetor	Vantagens	Desvantagens	
Viral	Integrativo	Retrovírus	Expressão duradoura, reprogramação consistente e confiável, boa eficiência, fácil de implementar, validado para vários tipos de células.	Mutagenese de inserção, expressão residual e reativação de transgenes, silenciando prematuro, tropismos limitados, representa perigo biológico, transdução múltipla, ações virais instáveis, imunogénicos.
		Lentivírus	Expressão duradoura de transgenes, reprogramação confiável e consistente, boa eficiência, fácil de implementar, amplo tropismo celular.	Mutagenese de inserção, expressão residual e reativação de transgenes, representa perigo biológico, imunogénicos, deixam marca genética mesmo quando excisados.
	Não integrativo	Adenovírus	Sem mutagenese insercional.	Baixa eficiência de reprogramação, integração espontânea elevada, expressão transiente dos transgenes, necessidade de títulos elevados, representa risco biológico.
		Vírus Sendai	Sem mutagenese insercional, expressão do transgenes duradoura, elevada eficiência de reprogramação, aplicável em vários tipos de células.	Requer preparação e medidas adicionais para a remoção viral, dispendioso, representa perigo biológico, imunogénico.
Não Viral	Integrativo excisável	Transposões PiggyBac	Sem mutagenese insercional, expressão de transgenes duradoura, boa eficiência, baixa imunogenicidade.	Baixa taxa de integração em comparação com vetores virais, integração aleatória de plasmídeos auxiliares, trabalho extra de excisão dos transgenes e rastreio.
	Não integrativo	Plasmídeos de expressão	Não integrativo, barato, sem preparação de vírus.	Baixa eficiência, necessidade de múltiplos ciclos de transfecção, integração ocasional, dificuldade de transfecção em células primárias, impede o uso de devido à necessidade de múltiplas transfecções, silenciamento do vetor.
		Minicirclo de DNA	Baixo silenciamento do transgenes, sem mutagenese insercional, menos imunogénico.	Expressão transiente, eficiência de reprogramação extremamente baixa, integração aleatória, etapa extra para a preparação do minicirclo, necessidade de múltiplas transfecções, limitado a um tipo celular (adipócitos).
		Plasmídeos Epissomais EBV	Sem mutagenese insercional, transfecção única, simples, de baixo custo, menos imunogénico, perda do plasmídeo após a conclusão da reprogramação.	Baixa eficiência de reprogramação, integrações aleatórias, silenciamento de transgenes, partição imperfeita de plasmídeos, não replica em células de roedores.
		Transdução de Proteínas	Sem mutagenese insercional.	Baixíssima eficiência de reprogramação, transdução múltipla, fatores de reprogramação de ação limitada, tempo de reprogramação longo, tecnicamente difícil de executar.
		Pequenas moléculas químicas	Sem mutagenese insercional.	Requer pelo menos um fator para ser transduzido.
		RNA sintético	Sem mutagenese insercional.	Expressão transiente, necessidade de transfecção múltipla, eficiência de reprogramação muito baixa, altamente imunogénico.
		miRNA	Não integrativo, síntese fácil, administração controlável no tempo e na concentração.	Ineficiente, expressão transiente, necessidade de múltiplas transfecções.

EBV: Epstein Barr Virus.

(Tabela adaptada de HU, 2014a, 2014b; LI *et al.*, 2014a e RAO & MALIK, 2012).

ANEXO II

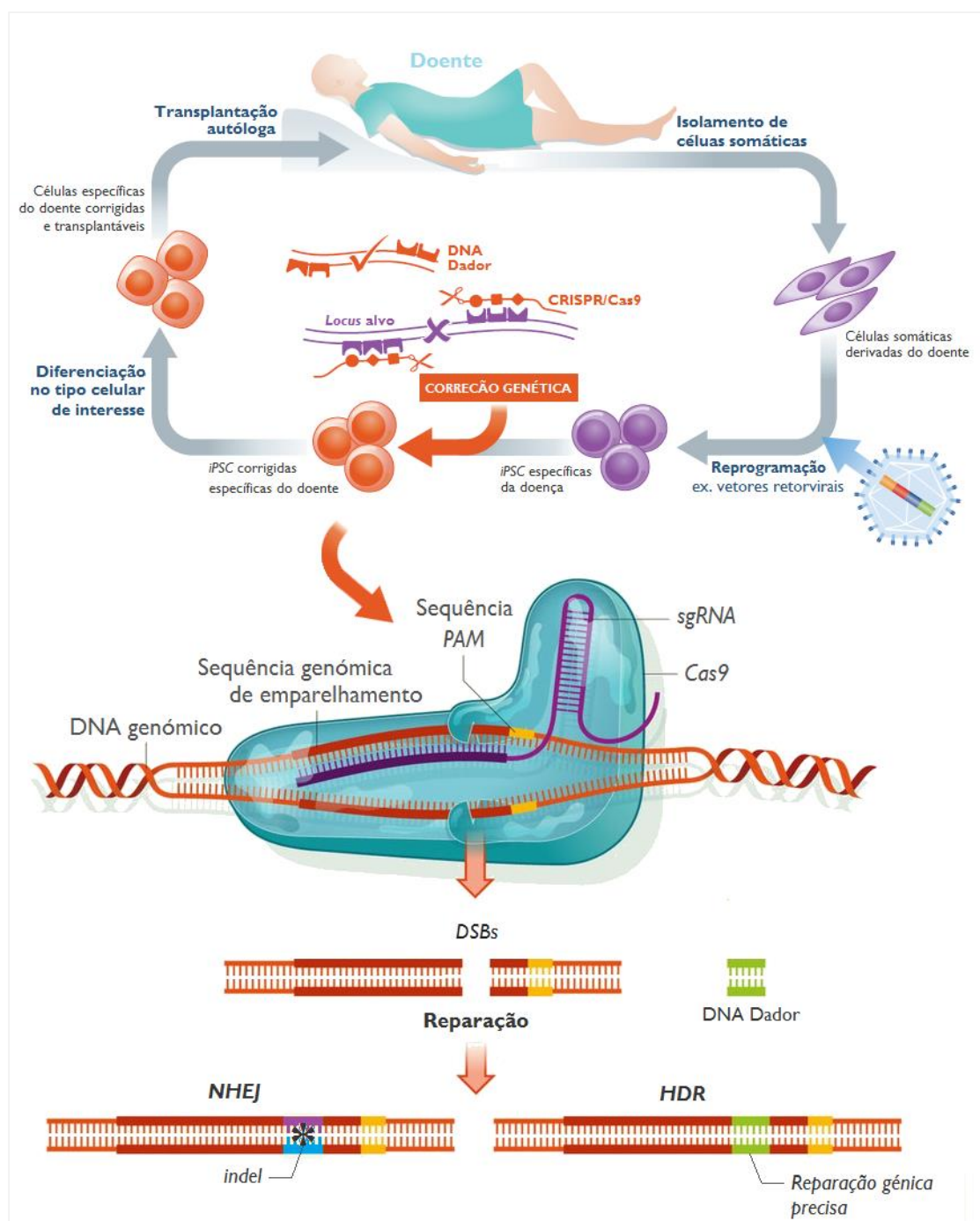


Figura 2 - Modelo conceptual de reparação génica de iPSC humanas através do sistema CRISPR/Cas9.

iPSC específicas do doente podem ser geradas a partir de células somáticas (ex. fibroblastos), através da entrega de determinados fatores de reprogramação por vetores apropriados. As iPSC geradas que apresentam a mutação causadora da doença são posteriormente submetidas a reparação genética por nucleases guiadas por RNA, através de um sistema designado de CRISPR/Cas9. Este sistema possui uma sequência de RNA guia (sgRNA) que reconhece, junto à sequência PAM, a sequência genómica de emparelhamento no DNA alvo. Feito o reconhecimento da sequência alvo, a nuclease Cas9 vai clivar a cadeia de DNA causando a formação de DSBs que serão reparadas por NHEJ, originando indels, ou por HDR, que utiliza o DNA dador como molde para fazer a reparação precisa da quebra. Depois de corrigidas, as iPSC são diferenciadas no tipo celular de interesse e reintroduzidas no doente por transplantação autóloga.

(Imagem adaptada de CHARPENTIER & DOUDNA, 2013 e de KAUFMANN *et al.*, 2013).