

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UniCEUB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

DIMITRI SOKOLOWSKEI

MECANISMOS E APLICAÇÕES DE NUCLEASES NA EDIÇÃO DE GENOMAS

Trabalho de conclusão de curso em formato de artigo elaborado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob a orientação do professor Dr. Paulo Roberto Martins Queiroz.

BRASÍLIA
2019

AGRADECIMENTOS

Diversas pessoas na minha vida foram essenciais até o presente momento, e conseqüentemente, para realização do presente trabalho. Agradeço a minha mãe por todo o apoio emocional e financeiro. Foi difícil, mas nós conseguimos. Agradeço aos meus irmãos, que contribuíram diretamente ou indiretamente para minha formação, especialmente ao meu irmão Renan. Não posso me esquecer do meu avô, “vei João,” e minha avó, “veia Antonieta”, que sempre estiveram ao meu lado e sempre valorizaram a minha educação, não como um meio, mas como um fim em si mesmo. Agradeço à minha tia Teresa, e ao meu tio João, pelo apoio e suporte incondicional. Por vocês tenho gratidão eterna.

Agradeço a minha amiga, companheira e amor Tatiana, que fez dos meus dias ao longo desses consideráveis dois anos, mais serenos e felizes. Suas dicas, opiniões e auxílio foram muitos importantes para o desenvolvimento do respectivo trabalho.

Aos meus professores, agradeço pelos conhecimentos e ensinamentos transmitidos. Não posso me ater em dizer algumas palavras a mais ao meu professor orientador Paulo. Agradeço pela paciência e disponibilidade. A sua humildade e sabedoria sempre me inspiraram e instigaram a querer saber e ser mais. Hoje tenho ambições e objetivos em áreas do conhecimento, não muito tempo atrás, transmitido pelo senhor. Por isso, deixo um sincero obrigado.

Mecanismos e aplicações de nucleases na edição de genomas

Dimitri Sokolowski¹
Paulo Roberto Martins Queiroz²

Resumo

A edição gênica caracteriza-se por modificações específicas na sequência base do genoma de células e organismos. A edição de genomas ganhou notoriedade com o surgimento de ferramentas sítio específicas capazes de reconhecer e clivar moléculas de DNA. Com isso, o objetivo do presente trabalho é descrever os mecanismos, componentes, propriedades e aplicações das principais ferramentas de edição gênica no tratamento de doenças em seres humanos. O presente trabalho é uma revisão narrativa onde o banco de busca foi PubMed. Fatores transcricionais codificados por eucariotos e proteínas secretadas por bactérias, associadas à nuclease *FokI*, garantiram o desenvolvimento de ferramentas de edição gênica como a ZFN e TALEN. O sistema CRISPR-Cas9 surgiu como importante tecnologia de edição gênica onde são utilizados um RNA guia e a ribonucleoproteína *cas9* para editar, virtualmente, qualquer sequência de DNA. Conclui-se que as ferramentas de edição genomas apresentam grande potencial para tratamento de doenças em seres humanos.

Palavras-chave: *CRISPR/Cas9; Genome Edition: CRISPR System; CRISPR Applications; ZFN; TALEN; Nucleases.*

Mechanisms and applications of nucleases in genome editing

Abstract

Genetic editing is characterized by specific modifications in the base sequence of the genome of cells and organisms. Genomes editing gained notoriety with the emergence of specific site tools capable of recognizing and cleaving DNA molecules. With this, the objective of the present work is to describe the mechanisms, components, properties and applications of the main genetic editing tools in the treatment of diseases in humans. The present work is a narrative review where the search database was PubMed. Transcriptional factors encoded by eukaryotes and proteins secreted by bacteria, associated with the FokI nuclease, ensured the development of genetic editing tools such as ZFN and TALEN. The CRISPR-Cas9 system has emerged as an important gene-editing technology where guidewire RNA and cas9 ribonucleoprotein are used to edit virtually any DNA sequence. It is concluded that genome editing tools have great potential for the treatment of diseases in humans

Keywords: *CRISPR/Cas9; Genome Edition: CRISPR System; CRISPR Applications; ZFN; TALEN; Nucleases.*

¹ Acadêmico de Biomedicina do UniCEUB

² Professor do UniCEUB

1. INTRODUÇÃO

O surgimento de inovadoras técnicas de sequenciamento e manipulação da molécula de DNA, a partir dos anos de 1970, proporcionaram avanços consideráveis na genética (ANSORGE, 2009; KHAN *et al.*, 2016). Assim, o progresso no conhecimento da organização de genomas, descoberta de genes e suas funções e reconhecimento de variações em genomas (mutações) permitiram o desenvolvimento de técnicas de clonagem e modificação de sequências de ácidos nucleicos (HSU; LANDER; ZHANG, 2014).

A modificação específica de genomas cresceu consideravelmente pelos desafios impulsionados pela medicina moderna, como na busca de novas drogas (FELLMANN *et al.*, 2016) e desenvolvimento de terapias gênicas (XIAO-JIE *et al.*, 2015). E ainda, dentro do contexto biotecnológico, pela necessidade de novas tecnologias para aperfeiçoamento da produtividade de plantações (CHAPARRO-GARCIA; KAMOUN; NEKRASOV, 2015), assim como, pela demanda de fontes de energia alternativas (SHIN *et al.*, 2016).

Entende-se como edição de genomas alterações pontuais e específicas de ácidos nucleicos, principalmente da molécula de DNA. Essas alterações têm como propósito de desativar, corrigir ou manipular a expressão gênica do genoma de distintos organismos para diferentes fins (GONÇALVES; PAIVA, 2017).

Abordagens mais eficazes e precisas para edição de genomas surgiram com as ferramentais *Zinc Finger Nuclease (ZFN)* e *Transcription Activator Like Effector Nuclease (TALEN)*. As ZFN são proteínas codificadas por organismos eucariotos, que consistem em domínios Cys2–His2 conservados onde cada domínio proteico pode interagir com até 3 pb de uma sequência de DNA (URNOV *et al.*, 2010). As TALEN são naturalmente codificadas pelas proteo-bactérias *Xanthomonas* sendo formadas por regiões conservadas de 33-35 aminoácidos com capacidade de pareamento de DNA (JOUNG; SANDER, 2013). A associação dessas proteínas de pareamento de DNA com a enzima de restrição *FokI* garantiu alta especificidade na alteração gênica (KIM; KIM, 2014).

A CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats Associated with Cas*) consiste num mecanismo de imunidade adaptativa de bactérias e arquea contra um fragmento de DNA exógeno, de origem plasmidial ou viral. A CRISPR-Cas9 é um *locus* presente em genomas bacterianos, caracterizado por séries de sequências repetitivas idênticas e interespaçadas por sequências de DNA proveniente de bacteriófagos onde são transcritas dando origem a CRISPR RNA (crRNA), que se pareiam a sequências específicas de DNA estranho, guiando a proteína Cas para clivagem (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014)

A CRISPR-Cas9 ganhou notoriedade na edição de genomas, pela capacidade de produção artificial de RNA guias (gRNAs), que mimetizam o papel do crRNA, e permitem a delimitação de sequências específicas de, virtualmente, qualquer molécula de DNA. Diante dessa propriedade a utilização da CRISPR-Cas9, no contexto de edição gênica, consolidou-se como uma importante alternativa em relação às ZFN e TALEN por contornar dificuldades de produção, aplicação e custo associadas a tais tecnologias (SANDER; JOUNG, 2014).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi realizar uma revisão narrativa sobre a utilização de nucleases na edição gênica e apresentar, assim como, descrever os mecanismos, componentes, propriedades e apresentar as aplicações destas tecnologias voltadas para edição de genomas visando o tratamento de doenças de difícil tratamento ou sem cura, em seres humanos.

2. METODOLOGIA

O presente trabalho descreveu os mecanismos e componentes básicos do uso de nucleases associadas a tecnologias de edição de genomas, assim como as possíveis aplicações destas ferramentas no tratamento de doenças em seres humanos.

A partir de uma revisão bibliográfica narrativa (VOSGERAU; ROMANOWSKI, 2014), o respectivo trabalho realizou uma síntese de artigos experimentais e de revisão, já publicados na literatura, reunindo um conteúdo de 100 artigos, de revisão e experimentais, sobre o tema tratado. As publicações utilizadas foram de um período dos últimos 10 anos, sendo utilizados artigos científicos de revistas internacionais. A base de dados que foi utilizada para procura da literatura foi: PubMed (US National Library of Medicine), e os artigos selecionados foram em inglês e português. Alguns artigos, fora do período de busca de 10 anos, foram utilizados por serem cruciais para o desenvolvimento sobre o tema.

As palavras chave para busca dos artigos nas bases de dados foram: *CRISPR/Cas9*; *Genome Edition*; *CRISPR System*; *CRISPR Applications*; *ZFN*; *TALEN*; *Nucleases*.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 Mutação e Reparo

O ácido desoxirribonucléico (DNA) é uma macromolécula longa, presente em todas as células de organismos vivos, sendo responsável pelo armazenamento das informações genéticas indispensáveis para formação e manutenção da vida. Por meio da molécula de

DNA, produtos gênicos derivados da transcrição e tradução de genes são codificados, resultando em moléculas funcionais essenciais para homeostase dos seres vivos (GRIFFITHS *et al.*, 2013).

Estruturas químicas denominadas nucleotídeos compõem as sequências que formam a molécula de DNA, sendo cada nucleotídeo constituído por um grupamento fosfato (PO₄), um açúcar (desoxirribose) e uma base nitrogenada dentro das quatro existentes, que são: Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) e Guanina (G) (ZAHA *et al.*, 2014).

O DNA, assim como outros componentes celulares, é suscetível a danos que pode levar a alterações na sequência base de nucleotídeos, denominadas de mutações (KARKI *et al.*, 2015). Apesar de ocorrerem naturalmente e serem importante fonte de variabilidade genética, as mutações podem resultar em significantes prejuízos nas funções normais dos seres vivos e são importante causa de diversas doenças de acometimento em seres humanos (CHATTERJEE; WALKER, 2017).

Comumente, mutações podem ser derivadas de erros endógenos ou exógenos. As mutações endógenas podem ocorrer em eventos cruciais como durante a replicação da molécula de DNA (MAZOUZI; VELIMEZI; LOIZOU, 2014) por meio de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou herdadas através dos progenitores (HOEIJMAKERS, 2009). Agentes ambientais, ou exógenos, como radiação ultravioleta, radioisótopos e agentes químicos (BASU, 2018) também são capazes de alterar quimicamente bases nitrogenadas, quebrar ligações covalentes entre nucleotídeos e gerar compostos intercalantes de DNA potencializando o surgimento de novas mutações (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

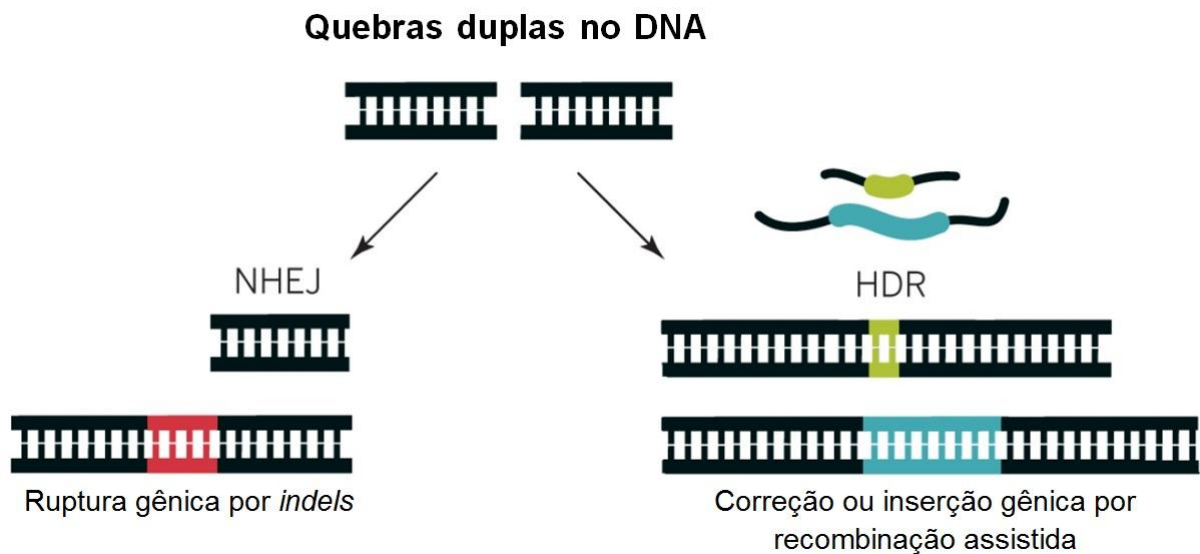
As mutações podem ser classificadas de acordo com seu local de acometimento, alteração molecular e efeitos fenotípicos. As alterações podem ser mínimas e extremamente comuns como no caso das mutações pontuais (inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP), caracterizadas por substituições, adições ou deleções de bases nitrogenadas. Um único SNP pode levar a outras mutações, tais como, mutações sem sentido resultando na produção de um códon de parada numa região codificante inapropriada ou a mutações com sentido trocado acarretando na troca de aminoácidos no códon mutado. Resultados mais graves como nas mutações que modificam a fase de leitura podem gerar alteração na leitura de cada códon posterior ao sítio alterado (GRIFFITHS *et al.*, 2013).

A molécula de DNA conta com diferentes e eficazes mecanismos de reparo e correção de mutações, onde diversas e principais vias de reparo são cruciais na manutenção da estabilidade genética da molécula (CHATTERJEE; WALKER, 2017). Cada um destes mecanismos é composto por distintos complexos proteicos e enzimáticos de reparo, onde são

ativados em determinados estágios do ciclo celular, a fim de executar "revisões" específicas na molécula de DNA, assim, corrigindo possíveis erros adquiridos e reduzindo a frequência de mutações (JACKSON; BARTEK, 2009).

No contexto da edição de genomas, a indução de quebra da fita dupla (inglês, *Double Strand Break*, DSB) pelas ferramentas de edição, são um pré-requisito para alteração gênica. Duas vias, de reparo nuclear, podem ser acionadas: união de extremidades não homólogas (inglês, *Non homologous end joining*, NHEJ) ou reparo por homologia direta (inglês, *homology directed repair*, HDR) (GAJ; GERSBACH; BARBAS III, 2013). A via NHEJ permite a adição aleatória de deleções e inserções na região alterada, denominada *indels*. A via HDR utiliza-se de sequências de DNA homólogos provenientes de cromátides irmãs ou DNA exógeno para corrigir mutações induzidas por DSB (figura 1) (LIN *et al.*, 2014).

Figura 1: Representação de reparo por NHEJ e HDR após quebra de fita dupla no DNA.



Fonte: Adaptado de DOUDNA; CHARPENTIER, 2014.

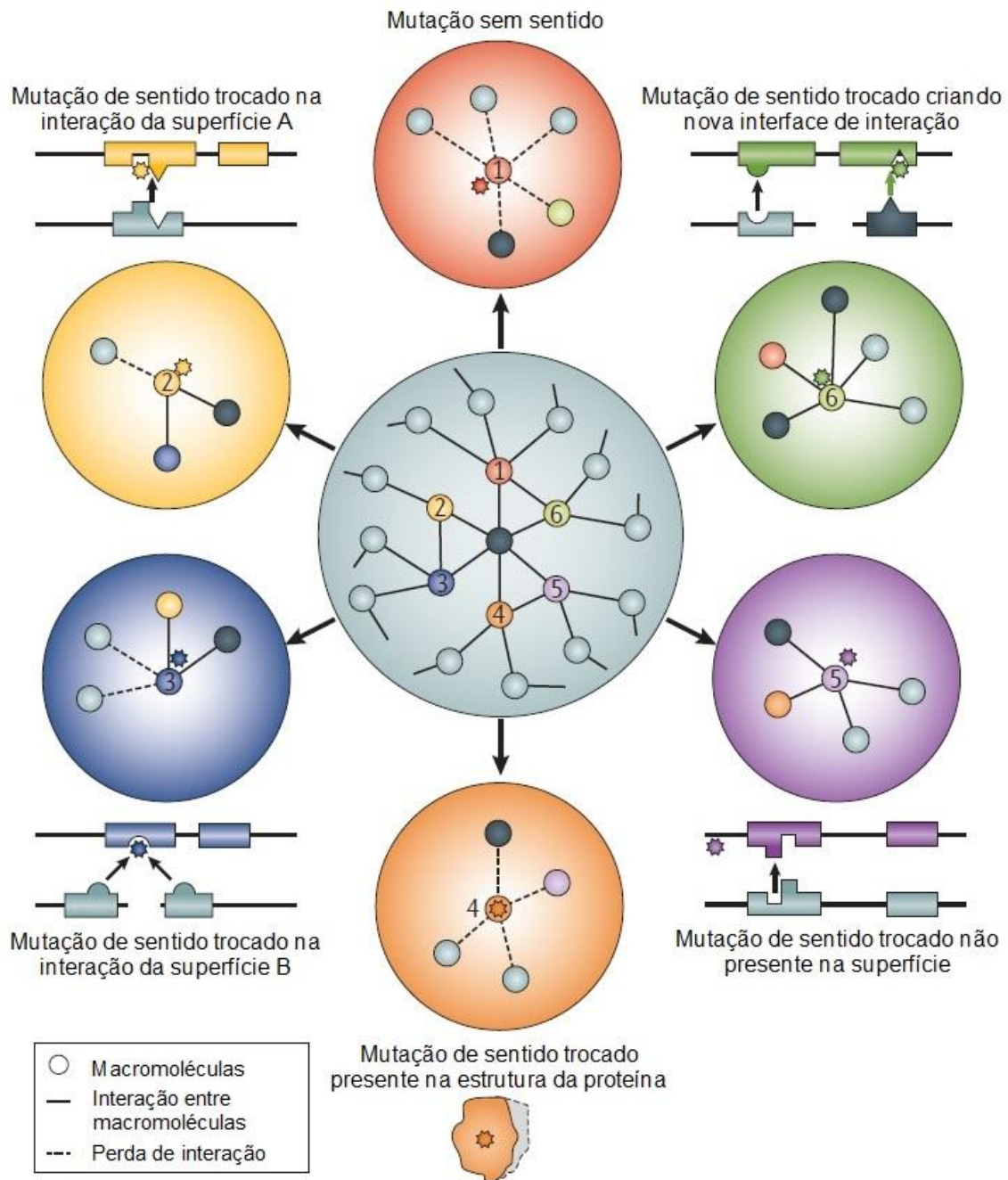
3.2 Mutações e as doenças genéticas

Apesar da molécula de DNA possuir uma maquinaria de reparo precisa e eficaz, nem todas as mutações geradas são possíveis de serem detectadas, ou passíveis de serem corrigidas (OKTAY *et al.*, 2015). O resultado desses eventos pode ser silencioso, não impactando em qualquer função do organismo. Todavia, quando expressadas, acarretam vários distúrbios e doenças genéticas de grande relevância (JACKSON *et al.*, 2018).

A relação entre genótipo e fenótipo de doenças genéticas é extremamente complexa, onde depende da interação de diversas redes de vias metabólicas e interações proteína-

proteína para que de fato um distúrbio possa se desenvolver (YI *et al.*, 2017). Os eventos associados à mutagênese são os mais comumente atribuídos a estas desordens, onde podem eliminar interações de um produto gênico de uma determinada via ou guiar a perturbações entre vias de sinalização resultando em ganho ou perda de específicas interações (figura 2) (CARTER; HOFREE; IDEKER, 2013).

Figura 2: Representação esquemática de perda e perturbações de interações específicas entre diferentes vias metabólicas decorrente de mutações.



Fonte: Adaptado de YI *et al.*, 2017.

A figura 2 exemplifica a interação de diversas macromoléculas entre si, estabelecendo uma densa e complexa rede de vias de comunicação. Mutações, como de sentido trocado, podem gerar macromoléculas anômalas, tais como proteínas alteradas, que acarretam na perda de interação normais entre si. Desta maneira, a perda destas interações pode impactar em múltiplas vias de sinalização, causando graves perturbações entre estas, comumente levando ao desenvolvimento de fenótipos patológicos (SAHNI *et al.*, 2013).

Os erros inatos do metabolismo são típicos exemplos de alterações genotípicas com desdobramentos fenotípicos. A fenilcetonúria (PKU), por exemplo, é causada por mutações no gene da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) que resulta na diminuição de sua atividade catalítica, impossibilitando a conversão de fenilalanina em tirosina (HAFID; CHRISTODOULOU, 2015). Um outro exemplo, como na deficiência na adenosina desaminase (ADA), uma importante enzima associada ao metabolismo de purinas, leva ao acúmulo de resíduos tóxicos resultante da degradação de purinas, gerando severos quadros de imunodeficiência (FLINN; GENNERY, 2018).

O câncer, similarmente, representa um espectro de doenças de acometimento genético, causado por mutações em genes essenciais na manutenção do ciclo celular, acarretando em proliferação celular anômala (HASSANPOUR; DEHGHANI, 2017). Os genes associados à carcinogênese são denominados de oncogenes ou genes supressores tumorais, envolvidos desde a produção de importantes proteínas e receptores de sinalização intracelular, até na indução de apoptose de células defeituosas (GRIFFITHS *et al.*, 2013).

A complexidade das neoplasias reside nas múltiplas alterações genéticas e interações anômalas que levam a doença. Em neoplasias de grande incidência e letalidade como carcinoma de mama, genes supressores tumorais *BRCA1* e *BRCA2*, juntamente com outros associados ao reparo do DNA, foram associados à doença (FILIPPINI; VEGA, 2013). Em outros tipos, como adenocarcinoma coloretal, mutações em genes envolvidos em vias de reparo do DNA impactam crucialmente na manutenção da estabilidade genética e molecular (MARKOWITZ; BERTAGNOLLI, 2009).

3.3 Terapia Gênica

A terapia gênica consiste no conjunto de sofisticadas tecnologias voltadas para o tratamento e resolução de doenças genéticas de acometimento humano. Essas abordagens comumente se baseiam na substituição de genes não funcionais por genes terapêuticos ou pela redução do produto gênico produzido pelo gene defeituoso (KAUFMANN *et al.*, 2013).

A substituição de genes para finalidade terapêutica necessita do emprego de sistemas ‘veículo’ responsáveis por carrear o gene estável e terapêutico até as células alvo. Esses sistemas de entrega, denominados vetores, podem ser de origem viral ou não viral, onde cada vetor apresenta suas próprias características, vantagens e desvantagens (COSTAZINI-STRAUSS; STRAUSS, 2015).

Os vetores não virais podem ser inseridos e inoculados diretamente no núcleo celular por técnicas físicas como microinjeções, eletroporação e biobalística apesar de apresentarem altas taxas de morte e dano celular e baixo nível de transfecção (WANG *et al.*, 2013). Outros vetores não virais baseados em lipossomas e polímeros catiônicos representam importante avanço de novos meios de entrega de DNA terapêutico (YIN *et al.*, 2014)

Os vetores mais utilizados em aplicações de terapia gênica são de origem viral como retrovírus, lentivírus, adenovírus e vírus adeno-associados, onde as propriedades exímias de invasão celular e integração de seus respectivos genomas na célula hospedeira destes microrganismos podem ser explorados, consistindo em uma excelente estratégia para entrega do material genético desejado (LINDEN, 2010). No entanto, limitações ainda associadas a estes vetores como imunogenicidade, dificuldade de produção do vetor e limitação de carregamento de DNA ainda são empecilhos associados a esta abordagem (COSTAZINI-STRAUSS; STRAUSS, 2015).

Nas últimas décadas, inúmeros estudos clínicos baseados em terapia gênica para doenças genéticas, como para doenças hematológicas, foram realizados onde diversas terapias apresentaram benefícios clínicos significativos (CAVAZZANA-CALVO *et al.*, 2010; HACEIN-BEY ABINA *et al.*, 2015). Entretanto, a complexidade de desenvolvimento de terapias gênicas reside ainda em dificuldades de inserção das novas informações genéticas através das barreiras celulares e, principalmente, na segurança dos pacientes tratados diante das possíveis adversidades geradas por vetores (SILVA *et al.*, 2011; NALDINI, 2015).

Visando, portanto, os inerentes riscos associados ao emprego de vetores virais e impasses relacionados as restrições das metodologias usuais, o uso de tecnologias sítio-específicas representa importante passo para desenvolvimento de terapias mais seguras e mais precisas (KAUFMANN *et al.*, 2013). Com o surgimento e desenvolvimento de inovadoras ferramentas de edição gênica associadas às nucleases, abordagens mais eficazes e precisas podem ser aplicadas para a terapia gênica e, conseqüentemente, na correção de genes causadores de doenças (YIN *et al.*, 2014).

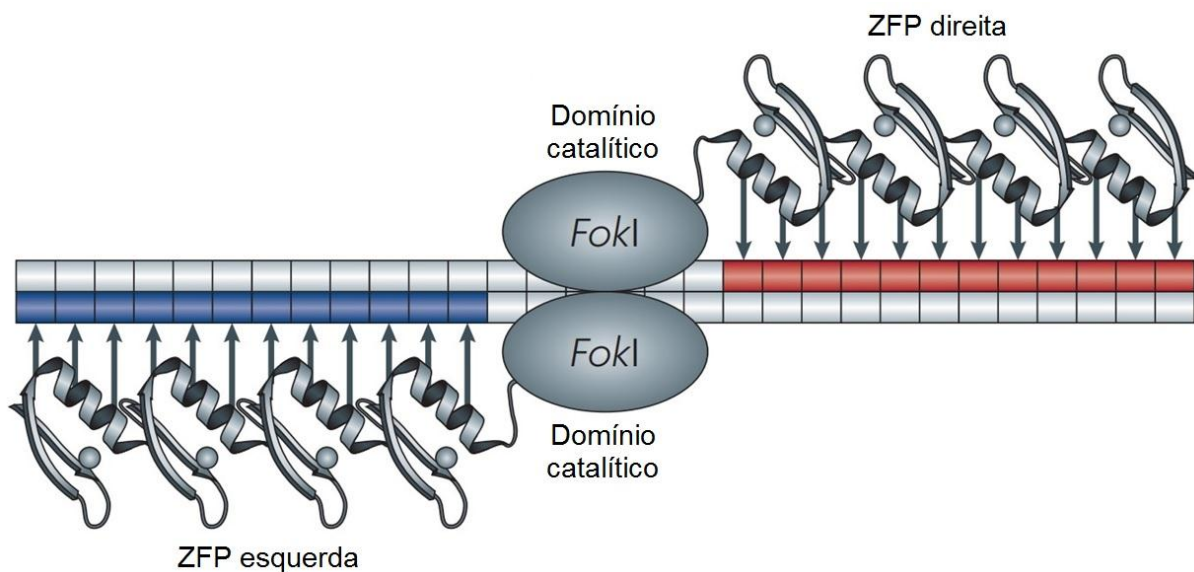
3.2.1. Nuclease Dedo de Zinco (ZFN)

A nuclease dedo de zinco (inglês, *Zinc Finger Nuclease*, ZFN) surgiu como um importante e versátil sistema para modificação e edição gênica. Kim e colaboradores (1996) foram os primeiros a indagar e demonstrar a possibilidade da utilização de endonucleases de restrição do tipo II em associação com domínios protéicos de pareamento de DNA, caracterizando assim a ZFN.

A arquitetura dessa tecnologia é formada por um domínio proteico, as proteínas zinco (inglês, *Zinc Proteins*, ZP), oriundo de uma classe de fatores de transcrição codificados em organismos eucariotos e um domínio baseado na enzima de restrição *FokI*. A partir desta formação estrutural, as ZFNs apresentam uma específica propriedade de pareamento ao DNA juntamente com uma robusta atividade catalítica (URNOV *et al.*, 2010).

As regiões ZP são compostas por Cys2-His2 em tandem, sendo cada uma destas sequências formada por aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos e associados a um íon de cobre (EMERSON; THOMAS, 2009). Cada domínio ZP possui a capacidade de reconhecer e se parear por complementaridade em 3 pares de base (pb) de uma determinada sequência de DNA. Com isso, a organização de *zinc fingers* em tandem permite a produção de sequências de tamanhos variáveis de pareamento, podendo chegar a zonas de reconhecimento de aproximadamente 18 pb (figura 3) (RAHMAN *et al.*, 2011).

Figura 3: Estrutura e componentes da ZFN.

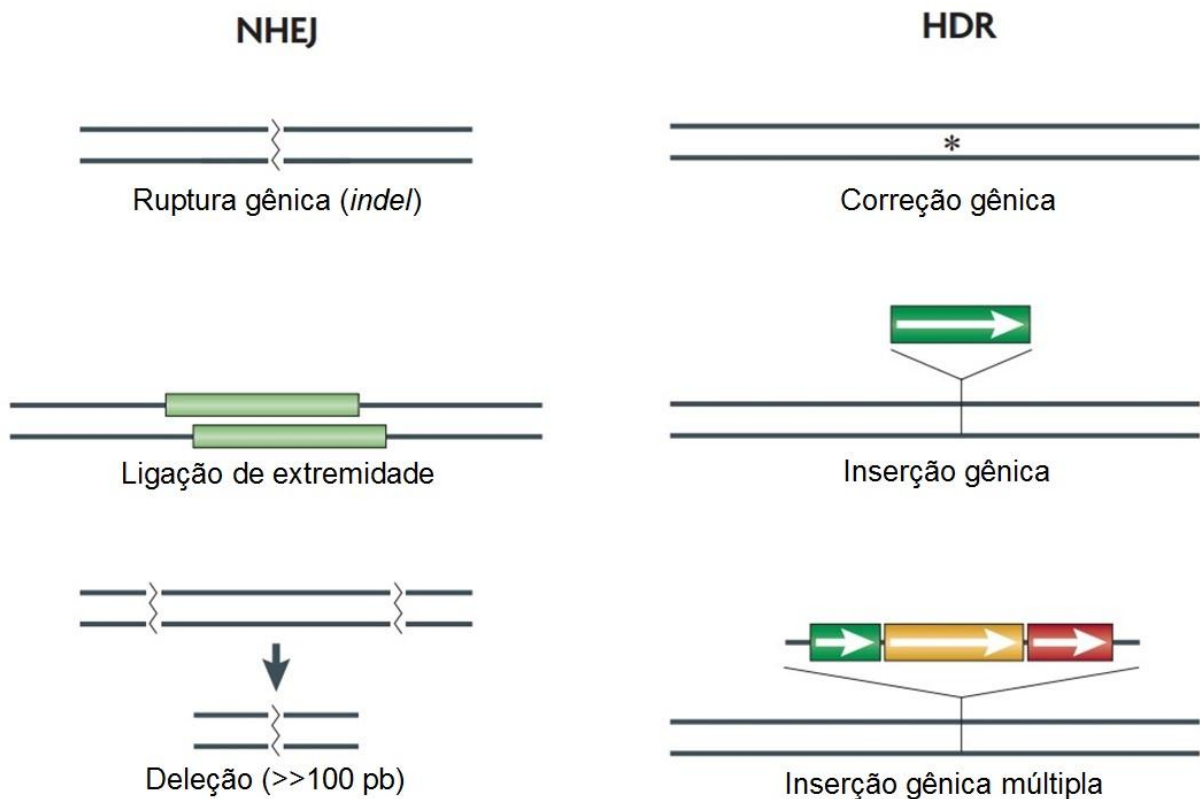


Fonte: Adaptado de URNOV *et al.*, 2010.

A capacidade de clivagem de sequências DNA específica depende prioritariamente do domínio *FokI*. Para isso, a dimerização do domínio catalítico *FokI* deve acontecer, sendo necessário a construção de domínios ZFN individuais que possam se parear corretamente em cada uma das fitas da molécula DNA adjacentes uma a outra na região do DNA ligado. Desta maneira, a dimerização da ZFN pode ocorrer, quebrando a região de sequência pareada (CARROLL, 2011).

A edição gênica baseada na utilização da ZFN consiste na introdução sítio-específica de DSB em sequências de DNA de interesse. Desta forma, as vias e mecanismos de reparo do DNA celular são capazes de corrigir a quebra de fita dupla induzida pela atividade catalítica da nuclease, acarretando em ganho ou perda de informações genéticas (indels) pela via NHEJ. Da mesma maneira, sequências de DNA podem ser introduzidas, pela via HDR, no sítio da DSB resultando na correção do gene defeituoso (figura 4) (URNOV *et al.*, 2010).

Figura 4: Representação de reparo por NHEJ e HDR após ação de ZFN.



Fonte: Adaptado de URNOV *et al.*, 2010.

A primeira aplicação das ZFN descrita na literatura foi realizada em *Drosophila melanogaster* onde a partir da formação de DSB no gene *yellow* do organismo, pode-se gerar diferentes indels na região produzidos mediante processo de reparo por NHEJ. Ainda

percebeu-se uma taxa de mutação do gene alterado em 0,44% de todas as proles geradas, indicando uma herdabilidade da mutações induzida por parte dos progenitores (BIBIKOVA *et al.*, 2002). Diversos outros organismos como *Caenorhabditis elegans* (WOOD *et al.*, 2011), *Arabidopsis thaliana* (ZHANG *et al.*, 2010) e diferentes cobaias (GEURTS *et al.*, 2009; CUI *et al.*, 2011) já foram alvos de alterações gênicas utilizando ZFN.

Em doenças de acometimento em seres humanos, a ZFN já foi utilizada para o desenvolvimento de linfócitos CD4+ resistentes a invasão do vírus da imunodeficiência humana (inglês, *Human Immunodeficiency Virus*, HIV) através da indução de mutações no gene *CCR5*, responsável pela codificação de um receptor transmembrana linfocitário. Sendo esse receptor um importante elemento de invasão Do HIV, mutação no gene *CCR5* implica em uma dificuldade de invasão viral em linfócitos T (PEREZ *et al.*, 2008).

Ainda, em doenças como imunodeficiência severa grave ligada ao X (X-SCID), pode-se observar em determinados estudos, taxas de alteração precisas no *locus* gênico IL2Rg em 20% das células avaliadas. Com isso, indicando uma eficaz capacidade da ZFN em gerar HDR em genes de interesse e implicando na possibilidade da técnica em correção de genes mutados (URNOV *et al.*, 2005).

3.2.2. Nuclease efetor pseudo-ativador de transcrição (TALEN)

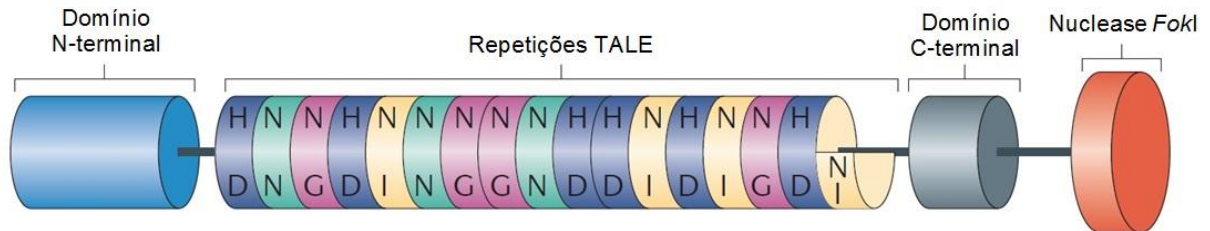
Os efetores pseudo-ativadores de transcrição (inglês, *Transcription Activator Like Effectors Nuclease*, TALE) são uma classe de proteínas provenientes de bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas spp.* que são inseridas em células de plantas acometidas por intermédio de uma via de secreção do tipo III. Essas proteínas, estruturalmente e funcionalmente ativas, uma vez dentro no núcleo celular, possuem a capacidade de se parear a determinadas sequências do DNA eucarioto vegetal (BOGDANOVE; SCHORNACK; LAHAYE, 2010).

A modulação transcricional, através das TALE, de determinados genes no genoma da célula hospedeira desempenha importante papel na patogênese das bactérias *Xanthomonas* (SCHOLZE; BOCH, 2011). Apesar de nem todos os mecanismos das TALEN quanto ao seu papel na virulência durante processos fito-infeciosos serem totalmente elucidados, aspectos de virulência como colonização e proliferação são potencializados (BOCH; BONAS, 2010).

As proteínas TALE são comumente compostas por três diferentes domínios. Um N-terminal responsável pela sinalização e secreção bacteriana, um domínio C-terminal que contém um localizador de sinais nucleares (NLS). Ainda, um domínio central, formado por

sequências repetitivas em tandem altamente conservadas, compreende a região de pareamento de DNA (figura 5) (WRIGHT *et al.*, 2014).

Figura 5: Representação dos componentes estruturais da proteína TALE.



Fonte: Adaptado de JOUNG; SANDER, 2013.

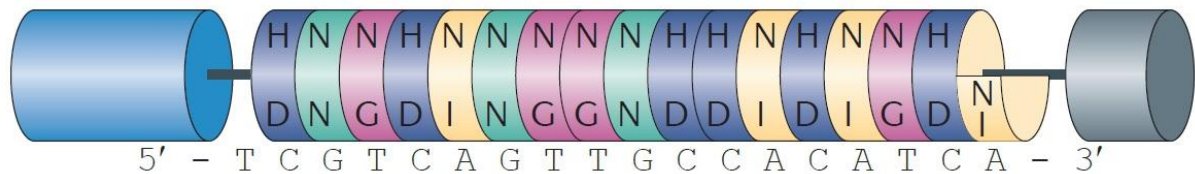
A propriedade de pareamento DNA específico das TALE é composta por arranjos em tandem de 15,5-19,5 repetições, onde cada uma destas é formada por aproximadamente 34 resíduos de aminoácidos altamente conservados. A capacidade e especificidade de pareamento a uma molécula de DNA é determinada por polimorfismos nas posições 12 e 13 de cada repetição dos arranjos denominados de repetições variáveis di-resíduos (inglês, *repeat-variable di-residue*, RVD) (MUSSOLINO; CATHOMEN, 2012).

Estudos a fim de entender os mecanismos de reconhecimento das TALE foram conduzidos. Foi demonstrado que diferentes RVD exercem um papel central no pareamento de diferentes nucleotídeos, onde foi possível identificar o “código” de pareamento das TALE de cada RVD a uma respectiva base (BOCH *et al.*, 2009). Dessa maneira, cada repetição dentro do domínio de cada TALE pode reconhecer um determinado nucleotídeo de uma sequência de DNA (MOSCOU; BOGDANOVE, 2009).

Os resíduos hipervariáveis mais comumente encontrados nas TALE e descritos na literatura são NN, NI, HD e NG, capazes de reconhecer e se parear, respectivamente, a guanina, adenina, citosina e timina. Ainda, estudos possibilitaram o desenvolvimento de novas RVD não encontradas naturalmente, expandindo o repertório e facilitando o pareamento de DNA específico (figura 6) (MILLER *et al.*, 2015).

Similarmente observado na ZFN, para a execução da alteração gênica a partir da TALE, é necessária a indução de DSB nos *loci* desejados. Após a dimerização da nuclease e clivagem da sequência de DNA pareada, os mecanismos intrínsecos de reparo celular, seja por NHEJ ou HDR, corrigirão a região alterada, finalizando o processo de edição gênica (figura 7) (BOGDANOVE; VOYTAS, 2011).

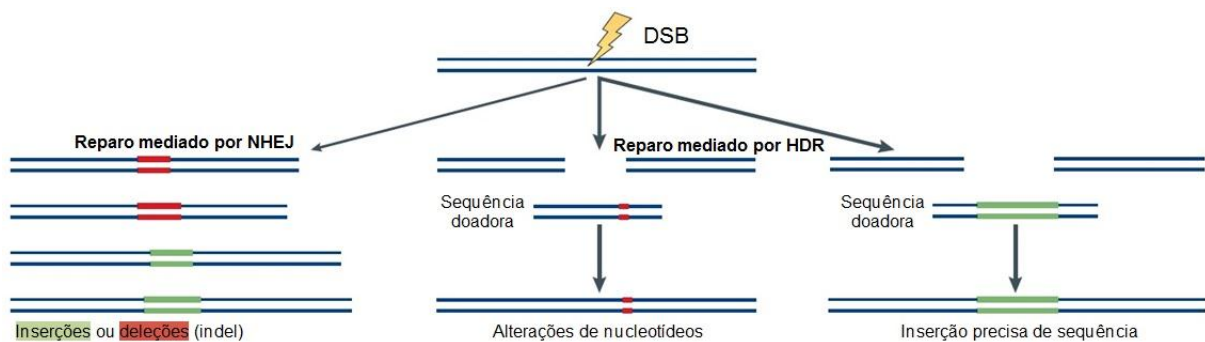
Figura 6: Representação da capacidade de pareamento ao DNA de acordo com cada RVD.



Fonte: JOUNG; SANDER, 2013.

O maior entendimento dos mecanismos de pareamento das TALE a partir das RVD, possibilitaram o surgimento das primeiras descrições do uso da tecnologia associada a enzimas de restrição *FokI* voltada para edição gênica, formando assim TALE Nucleases. As primeiras tentativas se basearam na substituição do domínio C-terminal das TALE de ocorrência natural para ativação da expressão gênica em plantas (MAHFOUZ *et al.*, 2011) e edição de genes em leveduras (LI *et al.*, 2011).

Figura 7: Representação de reparo por NHEJ e HDR após ação de TALEN.



Fonte: Adaptado de JOUNG; SANDER, 2013.

Ainda outros modelos biológicos, descritos na literatura, foram editados utilizando a TALEN. Nesse contexto, a tecnologia pode ser aplicada no nocaute gênico em camundongos (SUNG *et al.*, 2013), edição gênica de células somáticas de peixe zebra (SANDER *et al.*, 2011), produção de leite de cabra livre de alérgeno (CUI *et al.*, 2015) e produção de plantas de arroz resistentes a fitopatógenos (LI *et al.*, 2012).

O uso potencialmente terapêutico da TALEN em doenças de acometimento humano pode ser demonstrado por MA e colaboradores (2013) através da correção, por meio da via de reparo HDR, do gene da β -globina, pode-se reestabelecer a expressão gênica adequada em células tronco pluripotentes (PSC) e corrigir a mutação que caracterizava a β -Talassemia. A TALEN apresentou significativa capacidade *in vivo* e em cultura de células de desativar e

diminuir significativamente a carga viral do vírus da hepatite B (HBV), demonstrando a eficácia de nucleases dentro de um contexto terapêutico (BLOOM *et al.*, 2013).

3.3.3 CRISPR-Cas9

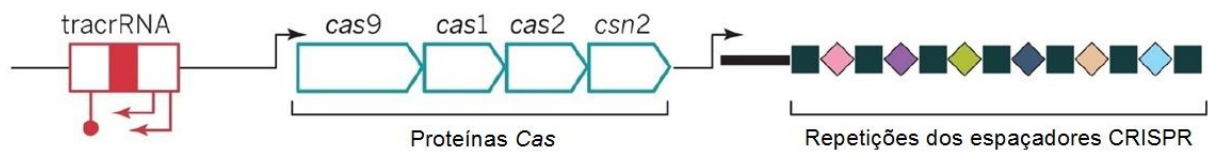
As repetições palindrômicas curtas interespaçadas e regularmente agrupadas associadas à proteína Cas (do inglês, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated with Cas*, CRISPR-Cas) consiste em um mecanismo de imunidade adaptativo bacteriano e de arqueas contra infecções provenientes de bacteriófagos e plasmídeos (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014). Este mecanismo de defesa é responsável pela degradação enzimática direta do DNA dos microrganismos infecciosos invasores (MALI *et al.*, 2013).

As primeiras descrições da CRISPR foram relatadas no final da década de 1980 quando cientistas japoneses observaram sequências de DNA repetitivas e altamente conservadas interespaçadas com sequências de DNA desconhecido no genoma da bactéria *Escherichia coli* (ISHINO *et al.*, 1987). Diversos estudos, nas décadas subsequentes, permitiram a identificação dessas sequências repetitivas em outros microrganismos (MOJICA *et al.*, 2000), assim como, pode-se verificar que as sequências de DNA desconhecidas, intercaladas com elementos repetitivos, eram de origem viral e plasmidial (MOJICA *et al.*, 2005).

A descoberta que o *locus* CRISPR é transcrito (TANG *et al.*, 2002) e apresenta genes (*Cas*) adjacentes a região (JANSEN *et al.*, 2002), permitiu inferir um possível papel dos *locus* CRISPR-Cas como um mecanismo de memória que se utiliza de moléculas de RNA antisense para se defender de reinfecções por bacteriófagos (MAKAROVA *et al.*, 2006). Tal hipótese pode ser confirmada por Barrangou e colaboradores (2007) e, no ano seguinte, foram identificados os CRISPR RNA (crRNA), sendo estes responsáveis por guiar as proteínas *Cas* ao DNA exógeno (BROUNS *et al.*, 2008).

Estruturalmente, o *locus* CRISPR-Cas é composto por séries de sequências repetitivas, intercaladas por sequências variadas e não repetitivas denominadas de espaçadores, que advém de fragmentos exógenos de material genético, chamados de protoespaçadores. Associados a esta região, encontram-se o(s) gene(s) *Cas* que codificam a nuclease *Cas9*, outras *Cas* regulatórias e o tracrRNA (figura 8) (HSU; LANDER; ZHANG, 2014).

Figura 8: Representação do *Loci* CRISPR-Cas.



Fonte: Adaptado de DOUDNA; CHARPENTIER, 2014.

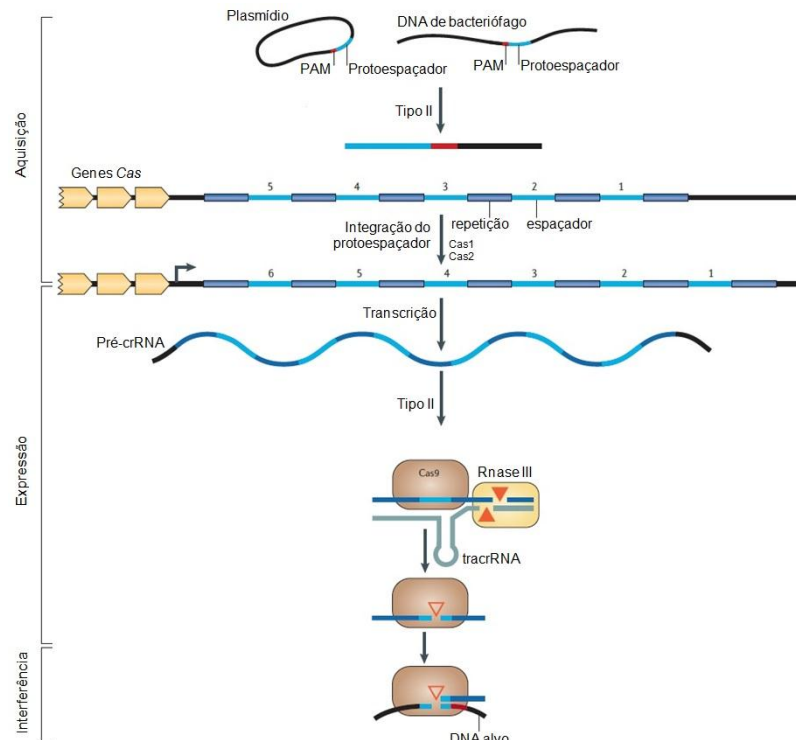
O desenvolvimento da imunidade adaptativa dos hospedeiros, mediante CRISPR-Cas, ocorre através de três diferentes fases. A primeira etapa, denominada de aquisição, consiste na inserção de curtos fragmentos do DNA invasor no *locus* CRISPR. Posteriormente, ao longo da fase de expressão, o *locus* é transcrito gerando um RNA CRISPR precursor (pré-crRNA) que, ao ser maturado, geram diversos crRNA's, cada um contendo uma sequência de um respectivo protoespaçador. E na fase de interferência, os crRNA's que apresentam complementaridade de bases ao material genético externo, guiam a(as) endonuclease(s) *Cas* para a quebra da sequência do DNA invasor (figura 9) (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; BARRANGOU; MARRAFFINI, 2014).

A elevada diversidade dos sistemas CRISPR-Cas distribuídas entre bactérias e arqueas, provavelmente é o resultado de um rápido e intenso processo evolutivo imunitário contra elementos genéticos móveis (do inglês, *mobile genetic elements*, MGE) (VAN DER OOST *et al.*, 2014). Devido a determinadas incongruências quanto à classificação e nomenclatura das diversas famílias das proteínas *Cas*, inicialmente descritas por Haft e colaboradores (2005), uma nova classificação mais consistente foi proposta agrupando os sistemas CRISPR-Cas em 3 tipos: tipo I, II e III (MAKAROVA *et al.*, 2011).

Os tipos I e III apresentam elevada similaridade entre si, já que ambas dependem predominantemente da família das proteínas *Cas6* para clivar as sequências espaçadores dos pré-crRNA's, para formar crRNA's individuais. A atividade catalítica da *Cas6* ocorre 8 nucleotídeos (nt) acima região 5' dos espaçadores, dessa forma gerando sequências crRNA's de 8 nt. Tipicamente, ambos os sistemas apresentam múltiplos complexos de proteínas *Cas* indispensável para a maturação do crRNA's e indução da atividade enzimática (BARRANGOU; MARRAFFINI, 2014).

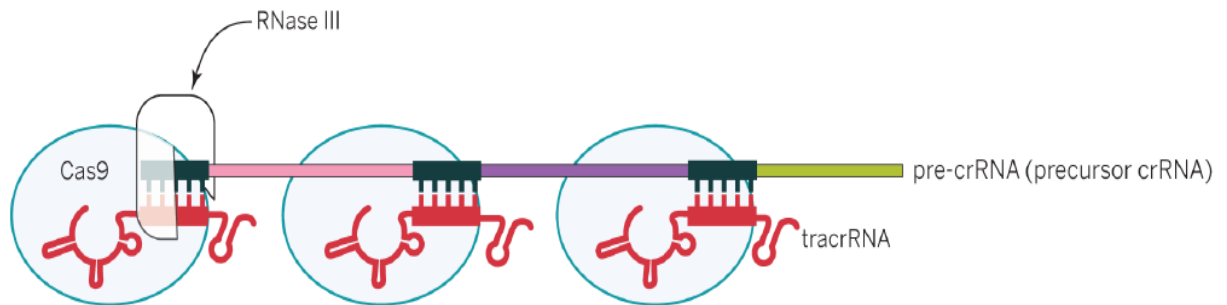
O tipo II, por sua vez, dispõe de um pequeno RNA, chamado de CRISPR transativador (tracrRNA), que pareia-se por complementaridade às repetições do pré-crRNA. O processo de pareamento, forma um substrato de RNA de fita dupla capaz de ser digerido por uma RNase III, codificada pelo gene *mnc*, que permite a clivagem do pré-crRNA em crRNA individuais e processados (figura 10) (DELTCHEVA *et al.*, 2011).

Figura 9: Representação do mecanismo imunitário adaptativo mediado por CRISPR-Cas9.



Fonte: Adaptado de MAKAROVA *et al.*, 2011.

Figura 10: Maturação de pré-crRNA em CRISPR-Cas9.



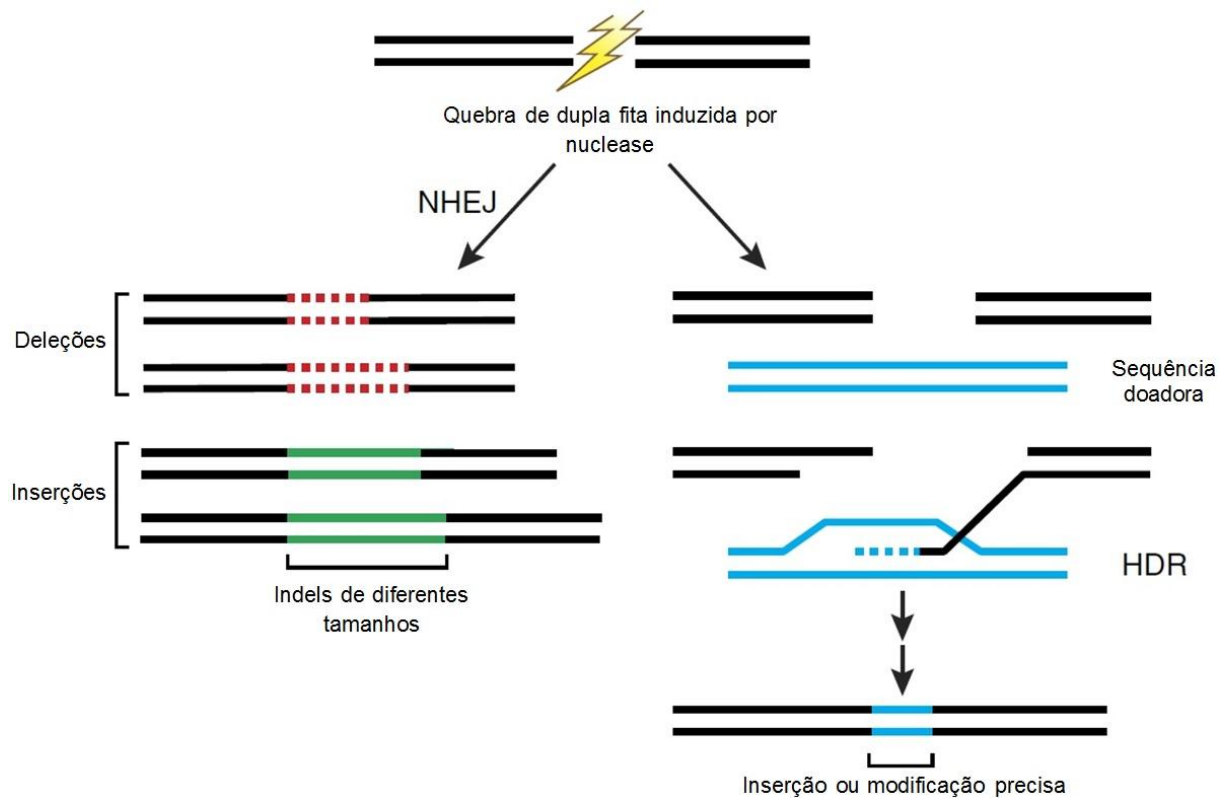
Fonte: DOUDNA; CHARPENTIER, 2014.

A atividade catalítica de sequências de DNA nos sistemas do tipo II depende de uma única proteína encontrada exclusivamente nesse tipo, a *Cas9*, que apresenta dois domínios catalíticos, que agem como nucleases, independentes. O domínio HNH consiste em um domínio de nuclease único, enquanto o domínio RuvC é dividido em três subdomínios ao longo da sequência da proteína (HSU; LANDER; ZHANG, 2014). Cada domínio enzimático é responsável pela clivagem de uma das fitas do DNA, sendo o domínio HNH implicado na

quebra da fita molde, e o domínio RuvC na quebra da fita complementar (GASIUNAS *et al.*, 2012).

O princípio básico de edição gênica da CRISPR-Cas9 consiste na indução de DSB na região a ser alterada pela *Cas9*. A quebra da sequência de DNA fita dupla, ativa vias de reparo celular possibilitando a produção de mutações aleatórias na região (indels) comumente induzidas pela via NHEJ. Apesar da via NHEJ ser eficaz na produção indels, esta não é precisa (MARUYAMA *et al.*, 2015). Desta forma, na correção específica de mutações, podem ser usados fragmentos de DNA exógenos, pela via HDR (figura 11) (WU *et al.*, 2013).

Figura 11: Representação de reparo por NHEJ e HDR após ação da CRISPR-Cas9.



Fonte: Adaptado de SANDER; JOUNG, 2014.

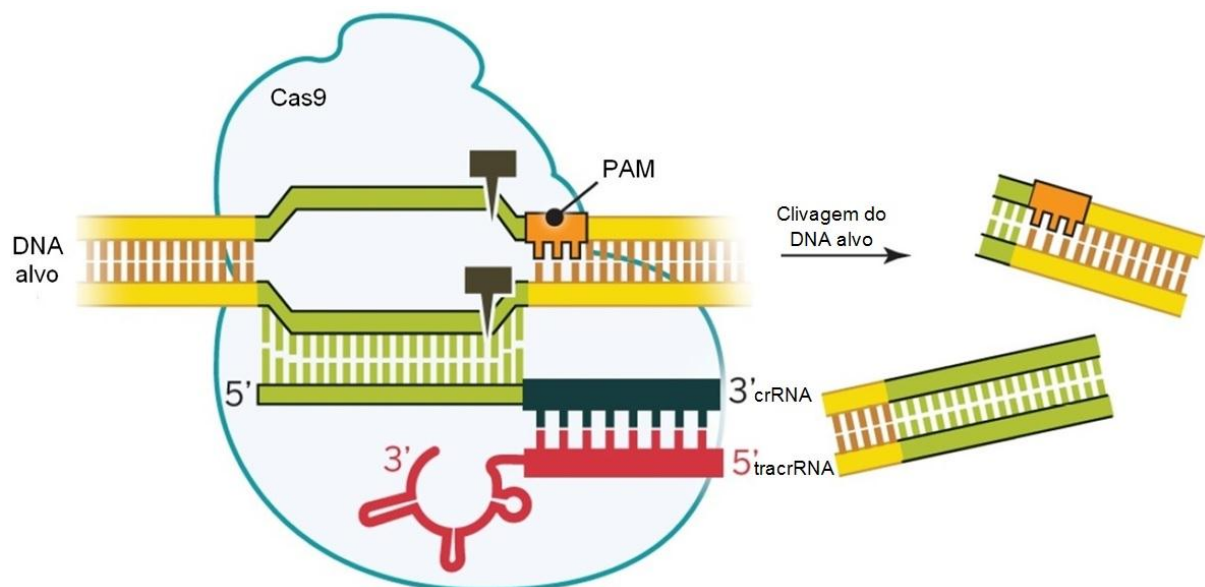
A atividade catalítica do sistema II, ou CRISPR-Cas9, é dependente da presença de uma sequência de DNA imediatamente subsequente a região de pareamento da molécula de crRNA, conhecidas como motivo adjacente ao protoespaçador (do inglês, *protospacer adjacent motif*, PAM). Essa região é essencial para o reconhecimento da região a ser clivada pela *Cas9*, além do reconhecimento da região PAM permitir a conversão da endonuclease para sua conformação ativa (NISHIMASU *et al.*, 2014; STEMBERG *et al.*, 2014). As regiões PAM de reconhecimento comumente são constituídas por sequências 5' NGG; NAG (HSU *et*

al., 2013), mas podem variar entre *Cas9* ortólogas (DEVEAU *et al.*, 2008; HORVARTH *et al.*, 2008).

Após a demonstração da primeira evidência experimental de que o *locus* CRISPR-Cas9 mediava imunidade adaptativa na bactéria *Streptococcus thermophilus* contra bacteriófagos líticos (BARRANGOU *et al.*, 2007) diversos grupos começaram investigar possíveis aplicações biotecnológicas. A utilização de culturas de bactérias para utilização industrial permitiu que o sistema CRISPR-Cas pudesse ser aproveitado como forma de imunização contra bacteriófagos, constituindo assim a primeira aplicação biotecnológica deste mecanismo (BARRANGOU; HORVARTH, 2012).

Jinek e colaboradores (2012) foram os primeiros a desenvolver um RNA duplo programável a partir da associação tracrRNA: crRNA quimérico, descrito na bactéria *Staphylococcus pyogenes*. Desta maneira, foi possível produzir uma molécula de RNA de guia simples (do inglês, *single guide RNA*, sgRNA) que possuía uma propriedade de pareamento de 20 nt na região 5' e uma estrutura de fita dupla na região 3' que se parecia a *Cas9*. Com isso, pode-se criar uma molécula, com dois distintos componentes, com capacidade de se parear a virtualmente qualquer molécula de DNA, adjacente a uma sequência PAM (figura 12).

Figura 12: Representação da clivagem do DNA alvo.



Fonte: DOUDNA; CHARPENTIER, 2014.

O domínio das propriedades do mecanismo e produção do sistema CRISPR-Cas9, em laboratório, permitiu ampla aplicação na edição de genoma dos mais variados organismos.

Modelos cobaias como *Drosophila* (YU *et al.*, 2013), peixe zebra (HWANG *et al.*, 2013), camundongos (PLATT *et al.*, 2014), ratos (LI *et al.*, 2013) e *Caenorhabditis elegans* (FRIEDLAND *et al.*, 2013) foram alvos de edição gênica.

Juntamente com as descrições da edição gênica utilizando CRISPR-Cas9 em organismos diversos, os primeiros relatos na edição gênica em células de seres humanos foram reportados (MALI *et al.*, 2013). Com isso, fora demonstrado a possibilidade e viabilidade de aplicações da tecnologia para terapia gênica em seres humanos (JINEK *et al.*, 2013).

Doenças hereditárias, e sem cura, como a distrofia muscular de Duchenne (inglês, *Duchenne muscular dystrophy*, DMD) caracterizadas por progressiva degeneração muscular, puderam apresentar uma significativa reversão do fenótipo patológico *in vivo*, pela correção de uma mutação sem sentido no éxon 23 do gene codificante da proteína distrofina (LONG *et al.*, 2014). A indução de mutações deletérias ao longo dos éxons 45-55 do gene da distrofina foi capaz de produzir uma proteína truncada, todavia funcional, resultando na recuperação da expressão gênica em células humanas (OUSTEROUT *et al.*, 2015).

Em doenças neurodegenerativas, como na doença de Huntington, estudos demonstraram a deleção em fibroblastos, utilizando dois distintos sgRNA, de todas as expansões repetitivas de sequências trinucleotídeos CAG no gene *HTT* que caracterizam a patologia, resultando na diminuição significativa da proteína huntingtina total (SHIN *et al.*, 2016). Resultados semelhantes foram encontrados por Monteys e colaboradores (2017) *in vivo* utilizando camundongos como modelo para doença de huntington.

Ainda, a aplicação do sistema CRISPR-Cas9 pode ser vista como uma potencial alternativa ao tratamento de infecções por SIDA (EBINA *et al.*, 2013). A produção de indels na região longa repetitiva terminal (inglês, *Long Terminal Repeat*, LTR) viral erradicou cópias do vírus do genoma de linfócitos T, assim como inibiu infecções virais primárias em linfócitos em meio de cultura (KAMINSKI *et al.*, 2016).

As ZFN e TALEN apesar de eficientes ferramentas para edição gênica apresentam consideráveis limitações quanto à dificuldade e necessidade de desenvolvimento das proteínas para cada sequência a ser editada, tempo de trabalho e inespecificidade (GAJ; GERSBACH; BARBAS III, 2013; JINEK *et al.*, 2013) Devido à simplicidade do sistema CRISPR-Cas9, a tecnologia foi rapidamente adotada pela comunidade científica com o objetivo de identificar, editar e alterar sequências de DNA e genomas dos mais diversos organismos (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de novas terapias e abordagens para o tratamento de doenças genéticas é particularmente difícil principalmente pelos próprios desafios e complexidade destas enfermidades. Ainda, a possibilidade de cura dessas condições muitas vezes é mínima ou inexistente, pois para a obtenção de um efeito terapêutico pleno, o material genético defeituoso e não funcional deve ser corrigido ou inibido para que o fenótipo patológico possa desaparecer.

Somente com o surgimento de tecnologias de edição sítio específicas baseadas em nucleases como ZFN, TALEN, e mais recentemente CRISPR-Cas9, que genomas puderam ser precisamente alterados com baixa inespecificidade e maior segurança. Diversos genes diretamente vinculados a doenças hereditárias, através dessas tecnologias, puderam ser totalmente corrigidos e infecções sem cura foram eliminadas do hospedeiro, algo sem precedentes.

Apesar do enorme potencial de uso dessas tecnologias para fins medicinais e biotecnológicos, questões éticas são de grande preocupação. A edição gênica com finalidade terapêutica abre uma real possibilidade de alteração genética em seres humanos, inclusive para fins não medicinais, levantando à tona a discussão sobre os limites da edição genética e seus possíveis desdobramentos, bons ou ruins, para a sociedade.

5. REFERÊNCIAS

AL HAFID, N.; CHRISTODOULOU, J. Phenylketonuria: a review of current and future treatments. **Translational Pediatrics**, Hong Kong, v. 4, n. 4, p. 304-317, oct. 2015.

ANSORGE, W.J. Next-generation DNA sequencing techniques. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 4, p. 195-203, apr. 2009.

BARRANGOU, R.; MARRAFFINI, L.A. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 54, n. 2, p. 234-244, abr. 2014.

BARRANGOU, R. *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science**, New York, v. 315, n. 5819, p.1709-1712, mar. 2007.

BARRANGOU, R. *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science**, New York, v. 315, n. 5819, p. 1709-1712, mar. 2007.

BARRANGOU, R.; HORVATH, P. CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification. **Annual Reviews of Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 3, p. 143-162, dec. 2012.

BASU, A.K. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. **International journal of molecular sciences**, Basel, v.19, n.4, mar. 2018.

BIBIKOVA, M. *et al.* Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in Drosophila using zinc-finger nucleases. **Genetics**, Austin, v. 161, n. 3, p. 1169-1175, jul. 2002.

BLOOM, K. *et al.* Inactivation of hepatitis B virus replication in cultured cells and in vivo with engineered transcription activator-like effector nucleases. **Molecular Therapy**, San Diego, v. 21, n. 10, p. 1889-1897, oct. 2013.

BOCH J. *et al.* Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. **Science**, New York, v. 326, n. 5959, p. 1509-1512, dec. 2009.

BOGDANOVA, A.J.; SCHORNACK, S.; LAHAYE, T. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 13, n. 4, p. 394-401, aug. 2010.

BOGDANOVA, A.J.; VOYTAS, D.F. TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. **Science**, New York, v. 333, n. 6051, p. 1843-1846, sep. 2011.

CARROLL, D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. **Genetics**, Austin, v. 188, n. 4, p. 773-782, aug. 2011.

CARTER, H.; HOFREE, M.; IDEKER, T. Genotype to phenotype via network analysis. **Current Opinion in Genetics and Development**, London, v. 23, n. 6, p. 611-621, dec. 2013.

CAVAZZANA-CALVO, M. *et al.* Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. **Nature**. London, v. 467, n. 7313, p. 318-322, sep. 2010.

CHAPARRO-GARCIA, A.; KAMOUN, S.; NEKRASOV, V. Boosting plant immunity with CRISPR/Cas. **Genome Biology**, Londres, n.16, p.254, nov, 2015.

CHATTERJEE, N.; WALKER, G.C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. **Environmental and molecular mutagenesis**, New York, v. 58, n. 5, p.235-263, jun. 2017.

COSTANZI-STRAUSS, E.; STRAUSS, B. Perspectivas da terapia gênica. **Revista De Medicina**, São Paulo, v. 94, n. 4, p. 211-222, dez. 2015.

CUI, C. *et al.* Gene targeting by TALEN-induced homologous recombination in goats directs production of β -lactoglobulin-free, high-human lactoferrin milk. **Scientific Reports**, London, v.5, n. 10482, p. 1-11, may. 2015.

CUI, X. *et al.* Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. **Nature Biotechnology**, New York, v. 29, n. 1, p. 64-67, jan. 2011.

DELTCHEVA, E. *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. **Nature**, London, v. 471, n. 7340, p. 602-607, mar. 2011.

DEVEAU, H. *et al.* Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, n. 4, p.1390-1400, feb. 2008.

DOUDNA, J.A.; CHARPENTIER, E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, New York, v. 346, n. 6213, p. 12580961-12580969, nov. 2014.

DOYON, Y. *et al.* Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. **Nature Biotechnology**, Nova York, v.26, n.6, p.702-708, jun. 2008.

EBINA, H. *et al.* Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. **Scientific Reports**, London, v. 3, n. 2510, p.1-7, aug. 2013.

EMERSON, R.O.; THOMAS, J.H. Adaptive evolution in zinc finger transcription factors. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 5, n. 1, p. e1000325, jan. 2009.

FELLMANN, C. *et al.* Cornerstones of CRISPR-Cas in drug discovery and therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, Londres, v.16, n.2, p.89-100, fev, 2017.

FILIPPINI, S.E.; VEGA, A. Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2. **Frontiers in Bioscience**, Searington, v. 18, n. 13, p. 58-72, jun. 2013.

FLINN, A.M.; GENNERLY, A.R. Adenosine deaminase deficiency: a review. **Orphanet Journal of Rare Disease**, London, v. 13, n. 1, p. 65, apr. 2018.

FRIEDLAND, A.E. *et al.* Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. **Nature Methods**, New York, v. 10, n. 8, p. 741-743, aug. 2013.

GAJ, T.; GERSBACH, C.A.; BARBAS, C.F. 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 31, n. 7, p. 397-405, jul. 2013.

GASIUNAS, G. *et al.* Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 39, p. e2579-e2586, sep. 2012.

GEURTS, A.M. *et al.* Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. **Science**, New York, v. 325, n. 5939, p. 433, jul. 2009.

GONÇALVES, G.A.R.; PAIVA, R.M.A. Terapia gênica: Avanços, desafios e perspectivas. **Einstein**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 369-375, jun. 2017.

GRIFFITHS, A.J.F. *et al.* **Introdução à genética**. 10. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

HACEIN-BEY ABINA, S. *et al.* Outcomes following gene therapy in patients with severe Wiskott-Aldrich syndrome. **JAMA**, Chicago, v. 313, n. 15, p. 1550-1563, apr. 2015.

HAFT, D.H. *et al.* A guild of 45 CRISPR associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. **PLoS Computational Biology**, San Francisco, v. 1, n. 6, p. 0474-0483, nov. 2005.

HOEIJMAKERS, J.H. DNA damage, aging, and cancer. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.361, n.15, p.1475-1485, out, 2009.

HORVATH, P. *et al.* Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, n. 4, p. 1401-1412, feb. 2008.

HSU, P.D.; LANDER, E.S.; ZHANG, F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. **Cell**, Cambridge, v.157, n.6, p.1262-1278, jun, 2014.

HWANG, W.Y. *et al.* Heritable and precise zebrafish genome editing using a CRISPR-Cas system. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 7, jul. 2013.

ISHINO, Y. *et al.* Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, n. 12, p. 5429-5433, dec. 1987.

JACKSON, M. *et al.* The genetic basis of disease. **Essays in Biochemistry**, London, v. 62, n. 5, p. 643-723, dec. 2018.

JACKSON, S.P., BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, London, v.461, n.7267, p. 1071-1078, oct, 2009.

JACKSON, S.P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, London, v. 461, n. 7267, p. 1071-1078, oct. 2009.

JANSEN, R. *et al.* Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 43, n. 6, p. 1565-1575, mar. 2002.

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

JINEK, M. *et al.* RNA-programmed genome editing in human cells. **eLife**, Cambridge, v. 2, n. 00471, p.1-9, jan. 2013.

JOUNG, J.K.; SANDER, J.D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 14, n. 1, p.49-55, jan. 2013.

KAMINSKI, R. *et al.* Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. **Scientific Reports**, London, v. 6, n. 28213, p. 1-14, jul. 2016.

KARKI, R.; *et al.* Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. **BMC Medical Genomics**, London, v.8, p.37, jul, 2015.

KAUFMANN, K.B. *et al.* Gene therapy on the move. **EMBO Molecular Medicine**, Chichester, v. 5, n. 11, p. 1642-1661, nov. 2013.

- KHAN, S. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. **International Journal of Genomics**, New York, p. 1-14, nov. 2016.
- KIM, H.; KIM, J.S. A guide to genome engineering with programmable nucleases. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 15, n. 5, p. 321-324, may. 2014.
- KIM, Y.G.; CHA, J.; CHANDRASEGARAN, S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 3, p. 1156-1160, feb. 1996.
- LI, D. *et al.* Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, n. 8, p. 681-683. aug. 2013.
- LI, T. *et al.* High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. **Nature Biotechnology**, New York, v. 30, n. 5, p. 390-392, may. 2012.
- LI, T. *et al.* Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 39, n. 14, p. 6315-6325, aug. 2011.
- LINDEN, Rafael. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. **Estudos avançados.**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 31-69, 2010 .
- LIN, S. *et al.* Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. **eLife**, Cambridge, v. 3, n. e04766, p. 1-28, dec. 2014.
- LONG, C. *et al.* Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. **Science**. New York, v. 345, n. 6201, p. 1184-1188, sep. 2014.
- MA, N. *et al.* Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated gene correction in integration-free β -thalassemia induced pluripotent stem cells. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 288, n. 48, p. 34671-34679, nov. 2013.
- MAHFOUZ, M.M. *et al.* De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 6, p. 2623-2628, feb. 2011.
- MAKAROVA, K.S. *et al.* Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 9, n. 6, p. 467-477, jun. 2011.
- MALI, P. *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. **Science**, New York, v. 339, n. 6121, p. 823-826, feb. 2013.
- MARKOWITZ, S.D.; BERTAGNOLLI, M.M. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 361, n. 25, p. 2449-2460, dec. 2009.

- MARUYAMA, T. *et al.* Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. **Nature Biotechnology**, New York, v. 33, n. 5, p. 538-542, may. 2015.
- MAZOUZI, A.; VELIMEZI, G.; LOIZOU, J.I. DNA replication stress: causes, resolution and disease. **Experimental Cell Research**, New York, v. 329, n. 1, p. 85-93, nov. 2014.
- MILLER, J.C. *et al.* Improved specificity of TALE-based genome editing using an expanded RVD repertoire. **Nature Methods**, New York, v. 12, n. 5, p. 465-471, may. 2015.
- MOJICA, F.J. *et al.* Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 60, n. 2, p. 174-182, feb. 2005.
- MONTEYS, A.M. *et al.* CRISPR/Cas9 Editing of the Mutant Huntingtin Allele In Vitro and In Vivo. **Molecular Therapy**, San Diego, v. 25, n. 1, p.12-23, jan. 2017
- MOSCOU, M.J.; BOGDANOVE, A.J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. **Science**, New York, v. 326, n. 5959, p. 1501, dec. 2009.
- MUSSOLINO, C.; CATHOMEN, T. TALE nucleases: tailored genome engineering made easy. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 23, n. 5, p. 644-650, oct. 2012.
- NALDINI, L. Gene therapy returns to centre stage. **Nature**. London, v. 526, n. 7573, p. 351-360, oct. 2015.
- NISHIMASU, H. *et al* Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. **Cell**, Cambridge, v. 156, n. 5, p. 935-949, feb. 2014.
- OKTAY, K. *et al.* BRCA Mutations, DNA Repair Deficiency, and Ovarian Aging. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 93, n. 3, p. 67, sep. 2015.
- OUSTEROUT, D.G. *et al.* Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. **Nature Communications**, London, v. 6, n. 6244, p. 1-13, feb. 2015.
- PEREZ, E.E. *et al.* Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 7, p.808-816, jul. 2008.
- PLATT, R.J. *et al.* CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. **Cell**, Cambridge, v. 159, n. 2, p. 440-455, oct. 2014.
- RAHMAN, S.H. *et al.* Zinc-finger nucleases for somatic gene therapy: the next frontier. **Human Gene Therapy**, New York, v. 22, n. 8, p. 925-933, aug. 2011.
- SANDER, J.D. *et al.* Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. **Nature Biotechnology**, New York, v. 29, n. 8, p. 697-698, aug. 2011.

- SANDER, J.D.; JOUNG, J.K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. **Nature Biotechnology**, Nova York, v. 32, n. 4, p. 347-355, abr. 2014.
- SAHNI, N. *et al.* Edgotype: a fundamental link between genotype and phenotype. **Current Opinion in Genetics and Development**, London, v. 23, n. 6, p. 649-657, dec. 2013.
- SCHOLZE, H.; BOCH, J. TAL effectors are remote controls for gene activation. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 14, n. 1, p. 47-53, feb. 2011.
- SHIN, J.W. *et al.* Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 25, n. 20, p. 4566-4576, oct. 2016.
- SHIN, S.E. *et al.* CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Scientific Reports**, London, v. 6, n. 27810, p. 1-15, jun. 2016.
- SUNG, Y.H. *et al.* Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, n. 1, p. 23-24, jan. 2013.
- URNOV, F.D. *et al.* Genome editing with engineered zinc finger nucleases. **Nature Reviews Genetics**, London v. 11, n. 9, p. 636-646, set. 2010.
- URNOV, F.D. *et al.* Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. **Nature**, London, v.435, n.7042, p.646-651, jun. 2005.
- VAN DER OOST J. *et al.* Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 12, n. 7, p. 479-492, jul. 2014.
- VOSGERAU, D.S.R; ROMANOWSKI, J.P. Estudo de revisão: implicações conceituais e metodológicas. **Revista Diálogo Educacional**, Curitiba, v. 14, n. 41, p. 165-189, abr. 2014.
- WANG, W. *et al.* Non-viral gene delivery methods. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Hilversum, v. 14, n. 1, p. 46-60, 2013.
- WOOD, A.J. *et al.* Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. **Science**. New York, v. 333, n. 6040, p. 307, jul. 2011.
- WU, Y. *et al.* Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 13, n. 6, p; 659-662, dec. 2013
- XIAO-JIE, L. *et al.* CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. **Journal of Medical Genetics**, Londres, v.52, n.5, p.289-96, may, 2015.
- YI, S. *et al.* Functional variomics and network perturbation: connecting genotype to phenotype in cancer. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 18, n. 7, p. 395-410, jul. 2017.
- YIN, H. *et al.* Non-viral vectors for gene-based therapy. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 15, n. 8, p. 541-555, aug. 2014.

YU, Z. *et al.* Highly efficient genome modifications mediated by CRISPR/Cas9 in *Drosophila*. **Genetics**. Austin, v. 195, n. 1, p. 289-291, sep. 2013.

ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, L.M.P. **Biologia Molecular Básica**. 5. Ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2014.

ZHANG, F. *et al.* High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 26, p. 12028-12033, jun. 2010.