

Fundação Oswaldo Cruz

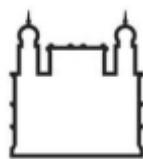
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira

**EFICÁCIA DO SISTEMA CRISPR/Cas NA EDIÇÃO GENÔMICA DO
GENE DA SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH**

Carla Cristina Pedrosa de Lira de Moraes

Rio de Janeiro

Março de 2017



Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira

**EFICÁCIA DO SISTEMA CRISPR/Cas NA EDIÇÃO GENÔMICA DO
GENE DA SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH**

Carla Cristina Pedrosa de Lira de Moraes

Dissertação apresentado à Pós-Graduação em
Pesquisa Aplicada à Saúde da Criança e da
Mulher, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Zilton Farias Meira de Vasconcelos

Coorientadores: Martin Hernan Bonamino e Flávio Henrique P. Braga

Rio de Janeiro

Março de 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Morais, Carla Cristina Pedrosa de Lira .

Eficácia do sistema CRISPR/Cas na edição genômica do gene da síndrome de Wiskott-Aldrich / Carla Cristina Pedrosa de Lira Moraes. - Rio de Janeiro, 2017.

104 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro - RJ, 2017.

Orientador: Zilton Farias Meira vasconcelos.

Co-orientador: Martin Hernan Bonamino.

Co-orientador: Flávio Henrique Paraguassú Braga.

Inclui Bibliografias.

1. Síndrome de Wiskott-Aldrich. 2. CRISPR. 3. Gene WAS. 4. Terapia genética. 5. Reparo por recombinação homóloga. I. Título.

Dedico essa dissertação à minha família, meus pais, Carlos e Edna, pelo apoio e incentivo. Ao meu marido, Anderson, pelo amor, cumplicidade, compreensão e incentivo para alcançar voos mais altos. Aos meus filhos, Nicole e Davi, que são meus estímulos. Sem vocês eu, se quer, teria chegado a essa etapa.

Agradecimentos

- Agradeço primeiramente a Deus pela força que me concede a cada dia para seguir meu caminho profissional e pessoal.
- Ao meu orientador, Zilton Vasconcelos, pela confiança depositada em mim para o desenvolvimento desse projeto, pela paciência e por todo ensinamento passado.
- Ao coorientador Martin Bonamino pelo apoio no desenvolvimento do projeto e por todo ensinamento passado.
- Ao coorientador Flávio Braga pelo apoio e incentivo em minha carreira profissional.
- A toda equipe “Martin Lab”: Leo Chicaybam, Luciana, Mayra e Bárbara (Babi) por me ensinarem com paciência toda a técnica de biologia molecular envolvida no projeto; Cintia, Luísa, Paula, Laura, Tonho, Priscila e Andreia pela companhia, conversas e apoio durante todo período que permaneci no Lab para o desenvolvimento do projeto.
- A toda equipe “NB2 Lab”: principalmente, Leonardo, Juliana Dutra, Gabriel, Christiane, Régis e Letícia que contribuíram de alguma maneira nessa minha trajetória. Em especial, minhas companheiras de turma, Juliana Pfisterer e Daniela Prado, obrigada pela ajuda, companhia, incentivos e conversas.
- A equipe BSCUP/INCA, Juliana Dias e Carlos Pinho pelas dicas, Baiense, Pedro, Ana Beherega (Marinha), Júlio e Miriam. Obrigada a todos pelo apoio e compreensão.
- A todos os amigos e familiares que contribuíram de alguma maneira para o desenvolvimento desse trabalho.
- À FAPERJ pelo apoio financeiro.

Lista de figuras

- Figura 1. Representação esquemática de WASP na conformação inativa e ativa.
- Figura 2. Representação esquemática de WASP na conformação inativa e ativa.
- Figura 3. Efeitos da ausência de WASP em múltiplas linhagens hematopoéticas.
- Figura 4. Sequência doadora *GFP/WAS*.
- Figura 5. Sequências guias.
- Figura 6. Sequência doadora *GFP/WAS* sintetizada.
- Figura 7. Digestão enzimática de DNA plasmidial recombinante contendo *GFP/WAS*.
- Figura 8. Seleção da região alvo.
- Figura 9. Inserção da sequência guia no vetor plasmidial.
- Figura 10. Eletroferograma.
- Figura 11. Análise por microscopia de fluorescência (EVOS) de células GFP^+ .
- Figura 12. Digestão enzimática de pX459 recombinante.
- Figura 13. Análise de inserção de *GFP/WAS*.
- Figura 14. Amplificação da região de edição pela Cas9.
- Figura 15. Amplificação da região de edição pela Cas9 após 26 dias de cultivo celular.
- Figura 16. Inserção da sequência doadora *GFP/WAS* no DNA genômico de células hematopoéticas.
- Figura 17. Amplificação da sequência de confirmação de inserção de *GFP/WAS* no DNA genômico de células hematopoéticas.
- Figura 18. Quantificação e identificação de colônias.
- Figura 19. Quantificação de GFP, por Citometria de fluxo, em células $CD34^+$.

Lista de tabelas

Tabela 1. Enzimas e respectivos tampões utilizados na digestão.

Tabela 2. Sequência de pares de primers (senso e reverso) para clonagem de RNAg, análise de região editada pela Cas9 e clonagem em vetor linearizado.

Tabela 3. Análise por citometria de fluxo da expressão de GFP plasmidial, pX458, em células HEK 293.

Tabela 4. Análise por citometria de fluxo da expressão de GFP proveniente da sequência doadora, em células hematopoéticas Jurkat e PBMC.

Tabela 5. Dados de celularidade das amostras.

Lista de gráficos

Gráfico 1. Frequência de mutação indel (Prisma 5.0).

Gráfico 2. Alinhamentos para região alvo (CrispRVariantsLite).

Resumo

A síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) é causada por mutações no gene *WAS*, que comprometem a função ou a síntese da proteína WAS (WASP). Correção gênica, *in vitro*, em células tronco e progenitoras hematopoéticas (CTPH) de pacientes, utilizando estratégias de vetores virais, tem sido realizada para tratamento da WAS, no entanto, a ocorrência de efeitos adversos decorrentes de inserções aleatórias, têm sido associados ao vetor. Nesse contexto, o presente projeto propõe o desenvolvimento de uma estratégia inovadora de terapia gênica, baseada no sistema CRISPR/Cas, para inserção e correção genética sítio-dirigida do gene *WAS*. O sistema CRISPR/Cas é composto por um RNA guia (RNAg) que interage com endonucleases da família Cas formando um complexo que é direcionado para o DNA alvo por meio de pareamento de bases e induzindo, dessa forma, a clivagem da sequência alvo. Dessa forma, duas sequências guias de 20 nucleotídeos, cada, que compõem o RNAg foram desenhadas, utilizando ferramentas computacionais. A avaliação da eficácia do RNAg em guiar a endonuclease para a clivagem da fita dupla de DNA genômico foi realizada através de caracterização do sítio alvo avaliando a presença de mutações indel no DNA genômico. Após a confirmação da eficácia do RNAg para consequente estímulo da edição gênica do gene *WAS*, via recombinação homóloga, através da inserção de um DNA doador pelo método de eletroporação (não-viral), foi realizada a quantificação, por citometria de fluxo, de proteína verde fluorescente (GFP) fusionada à sequência de correção do gene *WAS*, flaqueadas a braços de homologia 3' e 5', contendo aproximadamente 800 pb cada. Nossos resultados mostraram uma alta eficácia de um dos RNAg em localizar o potencial ponto de clivagem da fita dupla de DNA genômico, onde 93,3% das colônias editadas apresentaram mutação indel com pontos de clivagem compatíveis com a literatura. No entanto, a clivagem da fita dupla de DNA genômico realizada pelo RNAg não foi capaz de induzir uma inserção eficiente da sequência de DNA doador. Portanto, sugerimos avaliações adicionais para a otimização do desenho da sequência doadora e/ou uso de moléculas estimuladoras para aumentar a ocorrência de recombinação homóloga para inserção de DNA doador. Dessa forma, será possível provar o conceito da nova estratégia, sítio-dirigida, com finalidade terapêutica.

Palavras chave: Síndrome de Wiskott-Aldrich, CRISPR, Gene *WAS*, Terapia gênica, Reparo por recombinação homóloga

Abstract

Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) is caused by mutations in the *WAS* gene, which compromise the function or synthesis of the *WAS* protein (WASP). *In vivo* genetic correction in hematopoietic stem cells (HPSC) of patients using strategies based in viral vector have been performed to treat WAS, however, the occurrence of adverse effects arising from random insertions have been associated with vector. In this context, the present project proposes the development of an innovative strategy of gene therapy, based on the CRISPR/Cas system, for insertion and site-directed genetic correction of the *WAS* gene. The CRISPR/Cas system is composed of a guide RNA (RNAg) that interacts with Cas family endonucleases forming a complex that is directed to the target DNA by base pairing and thereby induces cleavage of the target sequence. Thus, two guide sequences of 20 nucleotides each, which compose the RNAg were designed, using computational tools. The evaluation of the efficacy of RNAg in guiding the endonuclease for the cleavage of the double strand of genomic DNA was performed by characterizing the target site by evaluating the presence of indel mutations in genomic DNA. After confirming the efficacy of the RNAg for the subsequent stimulation of the *WAS* gene, by means of the insertion of a donor DNA by the electroporation method (non-viral), the quantification, by flow cytometry, of protein fluorescent green (GFP) fused to the *WAS* gene correction sequence, flanked into 3' and 5' homology arms, containing approximately 800 bp each. Our results showed a high efficacy of only one of the RNAg in localizing the potential cleavage point of the double strand of genomic DNA, where 93.3% of the edited colonies presented indel mutation with cleavage points compatible with the literature. However, cleavage of the double strand of genomic DNA by RNAg was not able to induce efficient insertion of the donor DNA sequence. Therefore, we suggest additional evaluations for optimization of donor sequence design and/or use of stimulatory molecules to increase the occurrence of homologous recombination for insertion of donor DNA. In this way, it will be possible to prove the concept of the new strategy, site-directed, with therapeutic purpose.

Keywords: Wiskott-Aldrich syndrome, CRISPR-Associated Proteins, *WAS* gene, Genetic Therapy, Homology-directed repair

Desistir?

Eu já pensei seriamente nisso,
Mas nunca me levei realmente a sério
É que tem mais chão nos meus olhos do
Que cansaço nas minhas pernas
Mais esperanças nos meus passos do que
Tristeza nos meus ombros, mais
Estrada no meu coração do que
Medo na minha cabeça”

Cora Coralina

Sumário

EFICÁCIA DO SISTEMA CRISPR/Cas NA EDIÇÃO GENÔMICA DO GENE DA SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH.....	i
Agradecimentos.....	iii
Lista de figuras.....	iv
Lista de tabelas.....	v
Lista de gráficos.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Sumário.....	x
1. Introdução.....	13
2. Justificativa.....	17
3. Objetivos.....	19
3.1. Objetivo geral.....	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
4. Referencial teórico.....	20
4.1. Imunodeficiência primária.....	20
4.2. Síndrome de Wiskott-Aldrich.....	21
4.3. WASP: Função, estrutura e ativação.....	25
4.4. WASP nas células imunes.....	27
4.5. Transplante de células tronco e progenitoras hematopoéticas.....	31
4.6. Terapia gênica.....	32
4.7. Sistema CRISPR/Cas.....	34
5. Materiais e Método.....	36
5.1 Amostra.....	36
5.2 Cultivo celular.....	37
5.3 Cultura primária.....	37
5.3.1 PBMC.....	37

5.3.2	CTPH CD34 ⁺	38
5.3.2.1.	Cr�terios de inclus�o e exclus�o.....	38
5.3.2.2.	Coleta de SCUP	39
5.3.2.3.	Processamento	39
5.3.2.4.	Purifica�o de CTPH	39
5.4	Desenhos da sequ�ncia doadora <i>GFP/WAS</i> e RNAg	40
5.5	Plasm�deos	42
5.6	Clonagem	42
5.7	Digest�o enzim�tica de DNA plasmidial.....	43
5.8	Rea�o em cadeia por polimerase (PCR)	44
5.9	Eletropora�o	47
5.10	Extra�o e purifica�o de DNA	47
5.10.1	Extra�o e purifica�o por kit.....	47
5.10.2	Extra�o por fenol/clorof�rmio	48
5.11	Clonagem de produto de PCR em vetor pCR2.1 TOPO	48
5.12	PCR de col�nia	49
5.13	Sequenciamento	50
5.13.1	Rea�o de sequenciamento	50
5.13.2	Precipita�o da rea�o de sequenciamento.....	51
5.14	Purifica�o de c�lulas por citometria de fluxo.....	51
5.15	Citometria de fluxo	52
6.	Resultados	53
6.1	Constru�o e clonagem.....	53
6.1.1	Sequ�ncia doadora <i>GFP/WAS</i>	53
6.1.2	Sistema CRISPR/Cas9.....	55
6.2	Valida�o funcional dos RNAs: transfec�o e cultura de c�lulas HEK 293.....	58
6.3	Transfer�ncia g�nica de <i>GFP/WAS</i>	62
6.4	Valida�o do m�todo de transfec�o de CTPH CD34 ⁺ e ensaio funcional	69
7.	Discuss�o.....	73
8.	Conclus�o	78
9.	Perspectiva.....	78
10.	Refer�ncias	79

APÊNDICE I 89

APÊNDICE II 91

1. INTRODUÇÃO

As imunodeficiências primárias (IDP) possuem etiologia genética cuja principal característica está relacionada a alterações das funções do sistema imune, o que frequentemente resulta em infecções recorrentes e aumento da incidência de doenças autoimunes e neoplasias (1). A Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS; do inglês, *Wiskott-Aldrich Syndrome*) é uma IDP ligada ao cromossomo X caracterizada por infecções recorrentes, hemorragias graves e autoimunidade (2). A WAS é causada por mutações no gene *WAS*, que comprometem a função ou a síntese da proteína WASP (3). Essa proteína é sintetizada em células hematopoéticas, onde integra diversos estímulos extracelulares para regulação dos filamentos de actina no citoesqueleto e sinalização celular (4,5). Alterações na WASP prejudicam a função das células do sistema imune, como: migração *in vivo* de leucócitos; morte de patógenos por células NK (“natural killer”) e neutrófilos; apresentação de antígenos por células especializadas; “homing” de células B nos órgãos linfóides secundários levando a uma resposta humoral deficiente; defeitos na formação de sinapse imunológica e ativação de células T após estimulação de seu receptor (2,4,6–8).

Na WAS, as mutações genéticas que comprometem totalmente a função da proteína, estão associadas aos fenótipos mais severos da doença (9). Nesses casos, a indicação terapêutica é o transplante de células tronco e progenitora hematopoéticas (CTPH) alogênico, obtidas de doador saudável, que propõe a reconstituição do sistema imunológico com células saudáveis e eliminando assim as complicações clínicas desses pacientes (10,11).

As CTPH utilizadas neste tipo de procedimento podem ser obtidas de medula óssea (MO), sangue periférico mobilizado (SPM) ou sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP), além disso, são identificadas pela presença da proteína CD34 em sua superfície. As células tronco hematopoéticas são caracterizadas pela sua capacidade tanto de auto-renovação

como diferenciação em células progenitoras hematopoéticas comprometidas para a linhagem mieloide, linfoide, eritroide ou megacariocítica (12–14).

O sucesso terapêutico utilizando o transplante de CTPH alogênico alcança cerca de 70% dos casos, e os melhores índices são demonstrados quando utilizados doadores relacionados e HLA-idênticos, considerando a enxertia, a doença do enxerto contra o hospedeiro e infecções grave (15,16). Assim, o desenvolvimento da terapia gênica através de modificação genética de CTPH autogênica, para a correção da proteína WASP, vem sendo proposta como um tratamento alternativo para WAS, pois poderia não somente superar as limitações e morbidades relacionadas ao transplante alogênico, como também ser aplicável a todos os pacientes (16–18).

Existem trabalhos que demonstram, *in vitro*, a eficiência, segurança e estabilidade na transdução em diferentes tipos de células hematopoéticas humanas para a correção das mutações no gene WAS, utilizando estratégias de vetores virais (2,4,19). Em ensaios clínicos, trabalhos têm mostrado resultados de pacientes portadores de WAS submetidos a tratamento com terapia gênica, onde foram utilizadas duas famílias diferentes de vetores virais para a transdução de CTPH seguida de transplante autólogo (17,20,21). Entretanto, apesar de, no estudo, todos os pacientes terem apresentado melhora do quadro clínico original, sendo as intercorrências como, sangramento grave, infecções recorrentes e autoimunidade totalmente revertidas, ocorreram múltiplas inserções aleatórias do material genético transferido pela maquinaria viral, em ambas as estratégias (17,20). Em associação a múltiplas inserções, Braun e colaboradores (20) demonstraram uma alta incidência no desenvolvimento de leucemias agudas com a utilização de gama-retrovírus, enquanto que o grupo de Aiuti e colaboradores (17) ainda não detectaram nenhuma expansão clonal aberrante nos pacientes que receberam vetores lentivirais.

O sistema CRISPR (do inglês, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), descoberto inicialmente em bactérias, tem mostrado ser uma eficiente ferramenta para edição gênica em células de diversos organismos, incluindo ratos, camundongos e outros mamíferos (22–25). Esse sistema foi descrito como um sistema imunológico adaptativo de bactérias, constituído de curtas sequências repetidas, 20-50 pares de base (pb), regularmente intercaladas por sequências variáveis de nucleotídeos proveniente de DNA exógeno, chamadas de “espaçadores” (26). Algumas sequências repetidas são palindrômicas podendo gerar RNAs com estruturas estáveis em forma de gancho ou não estruturados, além disso, cada sequência repetida possui uma sequência conservada na extremidade 3’ que servem como sítio de ligação para uma ou mais endonuclease Cas (27). Os espaçadores, quando associado à proteína Cas forma o sistema CRISPR/Cas, que é dividido em três tipos (I, II e III) e pode conferir imunidade em diferentes fases através da utilização de seus transcritos (27).

A resposta imune adaptativa, em bactérias, mediada pelo sistema CRISPR/Cas é conferida por três estágios básicos: 1) Aquisição de DNA exógeno; 2) Biogênese de RNA-CRISPR (crRNA) e 3) Direcionamento do alvo. Durante a transcrição, é gerado inicialmente um pré-CRISPR RNA (pré-crRNA) que interage com RNA transativador (tracrRNA) formando o crRNA maduro denominado de RNA guia (RNAg) que interage com endonucleases da família Cas, forma um complexo que é direcionado para o DNA alvo por meio de pareamento de bases e induzindo, dessa forma, a clivagem da sequência alvo (27,28). No direcionamento da sequência alvo, cada RNAg está sempre associado a um motivo denominado de PAM (do inglês, *Protospacer Adjacent Motif*), o qual pode variar de acordo com o tipo de sistema CRISPR (27,29).

Nesse contexto, o presente projeto propõe o desenvolvimento de uma estratégia inovadora de terapia gênica, baseada no sistema CRISPR/Cas, para inserção e correção

genética guiada por RNA. Devido ao fato da WAS ser uma doença monogênica, o gene *WAS* foi identificado como sendo o mais indicado para nossa primeira manipulação genética, em células humanas, para transfecção *in vitro* com sistema de eletroporação (não-viral). Com a validação funcional do RNAg desenhado, confirmando a eficácia do sistema CRISPR/Cas na edição gênica do gene *WAS* e quantificação da eficiência de transferência gênica em células hematopoéticas de origem humana, será possível avançar os estudos para edição do gene *WAS* em CTPH avaliando sua multipotencialidade e proliferação pós-edição, provando o conceito da nova estratégia sítio-dirigida com finalidade terapêutica.

2. JUSTIFICATIVA

A terapia gênica utilizando CTPH tem surgido como uma estratégia inovadora para correção das desordens da IDP permitindo níveis de eficiência compatíveis com uma melhora do quadro clínico (17,30). Na WAS, a indicação terapêutica nos casos mais graves, é o transplante de CTPH alogênico, onde os melhores resultados clínicos são obtidos quando utilizadas células de doador HLA-idênticos (31).

O fato de a WAS possuir uma frequência de melhora clínica relativamente alta por transplante alogênico de CTPH, fornece uma perspectiva de eficácia dos tratamentos com base no transplante autólogo após correção gênica das CTPH (32). Além disso, as CTPH são facilmente acessíveis e passíveis de cultivo *in vitro* e transferência de genes, oferecendo uma melhor chance de sucesso na terapia gênica. Contudo, no contexto de IDP graves como na imunodeficiência combinada severa (SCID, do inglês *severe combined immunodeficiency*), as CTPH modificadas geneticamente apresentam vantagens seletivas sobre as populações de células não modificadas (33). Esses dados indicam que mesmo uma baixa eficiência de transferência do gene corrigido pode reverter completamente os sintomas clínicos.

Com base nas estratégias de terapias gênicas utilizadas atualmente, através da utilização de vetores virais, o sistema CRISPR/Cas, tem mostrado ser mais vantajoso devido ao fato da edição gênica poder ser feita de maneira dirigida, o que controlaria a aleatoriedade de pontos de inserção no DNA de células submetidas à transdução, como ocorre com vetores virais. Dessa forma, a correção e alteração genética podem ser realizadas inclusive no gene original, mantendo a estrutura e controle de expressão gênica endógena, minimizar genotoxicidade decorrente de inserções aleatórias, além de permitir a uniformização da terapia para todos os pacientes WAS. Portanto, este estudo visa avaliar a eficácia de uma

estratégia de terapia gênica inovadora o que poderá permitir uma futura implantação, em nosso país, de plataforma de ensaios pré-clínicos baseados nesse tipo de tecnologia.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a eficácia do sistema CRISPR/Cas na edição genômica de *WAS*

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a eficácia da endonuclease Cas9 guiada, na clivagem da sequência alvo no gene *WAS*;
- Caracterizar o sítio alvo da Cas9 guiada no DNA genômico, através de sequenciamento;
- Quantificar a eficiência de transferência gênica do *WAS* fusionado à GFP em células hematopoéticas.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. Imunodeficiência primária

As IDP compõem um grupo heterogêneo de doenças genéticas raras, compreendendo mais de 250 doenças clinicamente diferentes que afetam a via biológica de desenvolvimento e diferenciação do sistema imune (34). Em geral, as IDP são desordens monogênicas, de origem hereditária, predominantemente caracterizadas por infecções recorrentes com risco de vida, se não diagnosticadas e tratadas (34,35).

De acordo com a política nacional brasileira, portaria nº 199 de 30 de janeiro de 2014, considera-se doença rara aquela que afeta até 65 pessoas em cada 100.000 indivíduos, ou seja, 1,3 pessoas para cada 2.000 indivíduos (36). Nas IDP, os dados de prevalência e incidência global são desconhecidos, devido à variabilidade na metodologia de obtenção das informações em diferentes países levando a resultados inconsistentes. Estudos recentes têm sugerido que as IDP podem ser mais frequentes que o estimado anteriormente (37–39).

De acordo com a última atualização da classificação de IDP, após encontro em Londres, em março de 2015, compilado pelo Comitê de especialista da União Internacional de Sociedades Imunológicas, nos últimos dois anos, foram reportados 34 novos defeitos gênicos. E, considerando o defeito genético, se conhecido, doenças associadas às anormalidades imunológicas e algumas condições não-imunológicas, as IDP foram classificadas em (40):

- Imunodeficiência afetando imunidade humoral e celular;
- Imunodeficiências combinadas com características associadas ou sindrômicas;
- Defeitos predominantes de anticorpos;
- Doenças de desregulação imune;
- Defeitos congênitos de número de fagócitos, função ou ambos;

- Defeitos em imunidade inata e intrínseca;
- Desordem auto-inflamatória;
- Deficiências de complemento;
- Fenocópias de IDP.

Com a finalidade de reduzir a morbidade e mortalidade na IDP, em 1993, a Fundação Jeffrey Modell (<http://www.jmfworld.com>) e Cruz Vermelha Americana (<http://www.info4pi.org/aboutPI>) estabeleceram 10 sinais de alerta que são revisados periodicamente, sendo a mais recente em 2013, apresentando uma versão para adultos e outra para crianças, com várias traduções transculturais e, no caso do Brasil, sendo adaptado ao nosso meio pelo grupo brasileiro para imunodeficiência (BRAGID, do inglês Brazilian Group for Immunodeficiency) (37,41).

4.2. Síndrome de Wiskott-Aldrich

A WAS foi descrita em 1937 quando o pediatra alemão Dr. Alfred Wiskott identificou três irmãos, cujas irmãs eram saudáveis, apresentando características clínicas de eczema, trombocitopenia e infecções recorrentes desde a primeira infância, sendo notificadas as mortes precoces devido à hemorragia e infecções. Dessa forma, a doença foi associada a um defeito nas plaquetas e foi chamada de “trombopatia hereditária” (42).

Em 1954, a doença foi estudada em maiores detalhes pelo pediatra americano Dr. Robert Aldrich através do acompanhamento de 6 gerações de uma família holandesa afetada, sendo observado que vários meninos haviam morrido devido à trombopatia hereditária, com nenhuma menina afetada, baseado nisso, o pediatra americano propôs que essa doença tinha um padrão recessivo ligado ao cromossomo X (43). Na década de 60, com o reconhecimento desses pacientes, passaram a ser referidos como pacientes com síndrome de Wiskott-Aldrich.

Em 1994, Derryl e colaboradores sequenciaram pela primeira vez o gene responsável pela síndrome, localizado no braço curto do cromossomo X (44).

A incidência de IDP ligada ao cromossomo X é de aproximadamente 1 a 4 casos por 1.000.000 de nascidos vivos do sexo masculino, com uma média de idade para o diagnóstico de 24 meses, para os casos sem histórico familiar, e estima-se que a incidência da WAS seja de 1 a 10 em 1 milhão de indivíduos (45,32).

A WAS é, na maioria dos casos, causada por mutações pontuais no gene WAS localizado no braço curto do cromossomo X, apresentando 12 exons que codificam a proteína WASP (do inglês, *Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*) com 502 aminoácidos (44). Além disso, o gene WAS, possui dois promotores, cujas regulações gênicas *in vivo* ainda não estão bem compreendidas: 1) o promotor proximal, que fica imediatamente adjacente ao local de início da tradução, possuindo um padrão de expressão específico da linhagem hematopoética e 2) promotor distal, localizado 6 kb (quilobase) acima e também mostra atividade em linhagens de células hematopoiéticas (46–48). A WASP contém vários domínios funcionais que interagem com proteínas envolvidas na sinalização intracelular e regulação da polimerização dos filamentos de actina no citoesqueleto (49). Até o momento foram descritos aproximadamente 300 tipos de mutações no gene WAS envolvendo todos os 12 exons (43,44,49–51).

Na WAS, existe uma forte correlação entre genótipo e fenótipo, e de acordo com a manifestação clínica, a WAS pode ser classificada em: clássica, trombocitopenia ligada ao cromossomo X (XLT, do inglês *X-linked thrombocytopenia*) e XLT branda (52,31).

Para diferenciar os fenótipos causados por mutação no gene WAS e correlacionar a gravidade da doença, tem sido utilizado um sistema de pontuação, que varia entre 0 e 5, baseado nos sintomas clínicos (32,53). A WAS com pontuação igual ou maior que 3 é considerada como WAS clássica, cujo paciente apresenta trombocitopenia, eczema,

imunodeficiência e sequelas infecciosas (53), figura 1. Na presença de autoimunidade e/ou neoplasia é considerada como uma WAS com pontuação 5, representando um grupo com alto risco para morbidade e mortalidade. Um paciente com WAS pode transitar de uma WAS de baixa pontuação para uma de maior pontuação, e apesar dos mecanismos e fatores de riscos ainda serem desconhecidos, dados sugerem que essa transição pode ocorrer secundária a mudanças epigenéticas (54).

Pontuação		0,5	1	2	2,5	3	4	5
		Trombocitopenia ligada ao X				Síndrome de Wiskott Aldrich Clássica (WAS)		
Trombocitopenia		Inter	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Eczema		Não	Não	Suave	Mod	Mod	Sev	Suave-Sev
				e/ou	ou	e	e/ou	
Infeções		Não	Não	Suave	Mod	Mod	Sev	Suave-Sev
Malignidade/ autoimunidade		Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim
Trombocitopenia Severa, refratária		Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim
Expressão WASP	Normal							Ausente
Mutação gene WAS	Missense							Deleções Nonsense
Necessidade TCTPH	Baixa							Alta

Figura 1. Pontuação clínica de WAS. Pacientes WAS são pontuados de acordo com a severidade de seus eczemas e infecções, desenvolvimento de autoimunidade e/ou malignidade, assim como a presença de trombocitopenia severa, refratária (contagem de plaquetas $< 10 \times 10^9/L$, apesar do tratamento imunomodulatório). Pacientes com pontuação clínica igual ou maior que 3 são considerados com WAS clássica e menor que 3 com XLT. Numa correlação genótipo-fenótipo, os pacientes com XLT mostram ser mais susceptíveis a apresentarem a proteína WASP residual associada a uma mutação gênica missense, em que é codificado um aminoácido diferente, enquanto que os pacientes com WAS têm maior probabilidade de serem WAS nulo podendo

apresentar, no gene WAS, uma deleção, uma mutação nonsense ou mutação de parada precoce. Essa classificação ajuda a prever quais pacientes poderão desenvolver complicações graves e se beneficiariam de um transplante de CTPH (TCTH) precoce. Inter: Intermitente, Mod: Moderado. Esquema adaptado de Worth e Trasher, 2016.

A imunodeficiência na WAS está associada à deficiência no número e função das células T e B, resultando em maior suscetibilidade a infecções causadas por uma grande variedade de patógenos (45,32). Além disso, os níveis de imunoglobulinas também estão alterados em pacientes WAS e apesar dos números de neutrófilos, monócitos e outros fagócitos estarem normais, assim como, das células “natural killer” (NK) e células T reguladoras (Treg), as funções dessas células na resposta imunológica estão prejudicadas (51,52,55).

Estima-se que 40% dos pacientes WAS desenvolvem autoimunidades que podem estar associadas à alteração na homeostasia das células T e B, além de alterações funcionais das células Treg, contribuindo para que parte desses pacientes apresente potencial para o desenvolvimento de múltiplas doenças autoimunes, sendo as mais comuns: anemia hemolítica, vasculite, doença renal e artrite crônica (45,56–58).

A literatura mostra que 13-20% dos pacientes WAS desenvolvem algum tipo de neoplasia, sendo a mais comum o linfoma não-Hodgkin (LNH) quando comparado ao linfoma de Hodgkin (LH), no entanto, outras neoplasias como, mielodisplasia, leucemia e doenças mieloproliferativas também tem sido descrita (28,45). Dados históricos mostram que a taxa de mortalidade de pacientes WAS que desenvolvem algum tipo de neoplasia é de 95% (45).

O desenvolvimento de eczemas ocorre em cerca de 80% dos pacientes (53). Assim, a trombocitopenia é a segunda manifestação mais comum em pacientes WAS, entretanto, a gravidade é variável e está associada ao risco de sangramento (45,59). Apesar do número de megacariócitos ser normal em pacientes WAS, a formação das plaquetas é anormal, o que

pode estar associado à função prejudicada de WASP no processo de formação plaquetária, ativação e remodelagem do citoesqueleto nestas células (60,61).

O tratamento convencional para a WAS inclui: antibioticoterapia prolongada, repetida e, alguns casos, permanente; transfusões de plaquetas para os casos de hemorragias graves; uso de imunoglobulinas intravenosa, indicado para os pacientes que apresentam deficiência importante de anticorpos e uso de imunossupressor, quando houver manifestação autoimune (32). Entretanto, o cuidado padrão para crianças com WAS clássica é o transplante precoce de CTPH a fim de prevenir o desenvolvimento de complicações como, infecções significativas, sangramento ou autoimunidade (53). No entanto, no Brasil o tratamento é mais conservador e só vai a transplante os pacientes graves.

4.3. WASP: Função, estrutura e ativação

A regulação do citoesqueleto de actina é importante para permitir processos celulares básicos como, motilidade, divisão, diferenciação e endocitose (62). A WASP é sintetizada em células hematopoéticas não-eritróide e possui diversas funções no sistema imunológico, atuando como um importante regulador do citoesqueleto de actina, integrando eventos de sinalização de superfície celular, como o recrutamento e a localização de proteínas estruturais e quinases proporcionando a polimerização de actina, rearranjo do citoesqueleto e formação de podossomos (53,63). Os podossomos são estruturas protusivas especializadas associadas à degradação da matrix extracelular e migração celular invasiva (64).

Em sua estrutura, a WASP apresenta: 1) em sua porção amino terminal, um domínio 1 homólogo à Ena/VASP 1 (EVH1, do inglês *Ena/VASP homology domain 1*), também chamado de domínio 1 homólogo a WASP (WH1, do inglês *WASP homology domain 1*); 2) uma região básica (BR, do inglês *basic region*); 3) um domínio de ligação à GTPase (GBD,

do inglês *guanosine triphosphatase-binding domain*); 4) uma região rica em prolina (PPP, do inglês *polyproline rich region*); 5) e, em sua porção carboxi-terminal, uma região composta por domínios de homologia à verprolina, central e regiões ácidas (VCA, do inglês *verprolin homology/central/acidic domain*) (65).

O domínio VCA é um sítio ativo de WASP que se liga ao complexo de proteínas Arp2/3 para a formação de filamento de actina a partir de um núcleo preexistente formado por três monômeros de actina globular (66). Quando em repouso, a WASP apresenta seu domínio VCA ligado ao domínio GBD ocultando o sítio de ligação à Arp2/3 e, dessa forma, mantendo a proteína em uma conformação auto-inibitória, estabilizada pela ligação com a proteína WIP ao domínio EVH1 (5,53).

A atividade de WASP pode ser regulada pela ligação de Cdc42-GTP (do inglês, *Cell division control protein 42 homolog - Guanidine Triphosphate*) ao domínio GBD. Essa ligação, junto à fosforilação de tirosina 291, ligação de PIP₂ (do inglês, *phosphatidylinositol(4,5)-biphosphate*) à região BR, ligação de TOCA1 (do inglês, *transducer of CDC42- dependente actin assembly 1*) ao PPP e Cdc42-GTP, assim como a ligação de moléculas adaptadoras, como Nck e Grb2 ao PPP, induz uma mudança conformacional de WASP e estabiliza sua configuração ativa, aumentando a atividade de Arp2/3 através da liberação do domínio VCA em decorrência do rompimento do núcleo hidrofóbico (9,53,67), figura 2. A associação de múltiplas proteínas aos domínios de WASP, incluindo a ligação de proteínas adaptadoras que possuem o domínio SH3 como Nck ou CrKL, à WIP promove o recrutamento de WASP para o sítio de ativação (65,67).

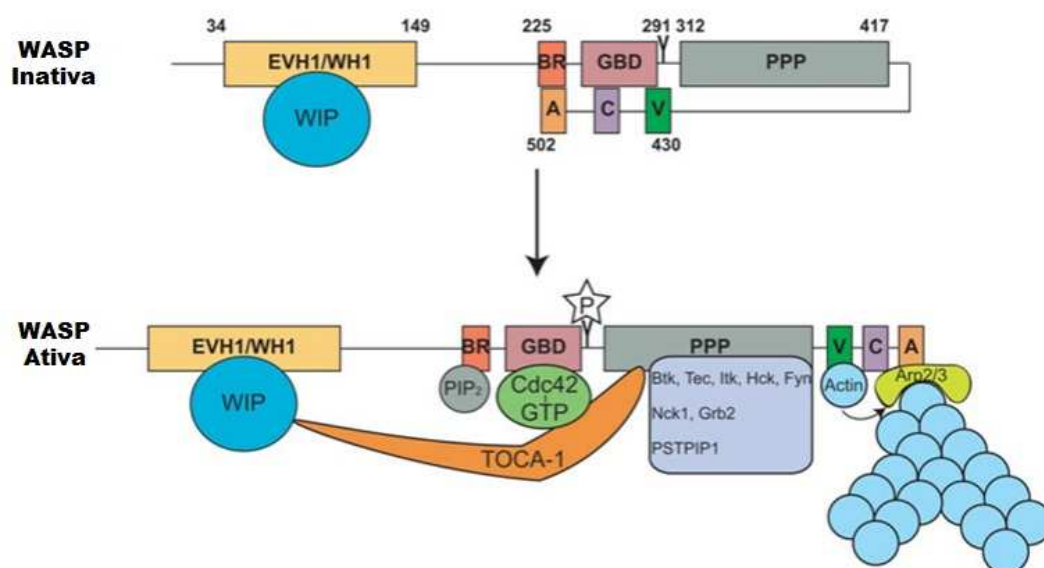


Figura 2. Representação esquemática de WASP na conformação inativa e ativa. A molécula WASP, com 502 aminoácidos, é encontrada em sua forma inativa no citoplasma celular numa conformação fechada, apresentando o domínio VCA, através de sua região hidrofóbica central, ligado ao domínio GBD. A ativação de WASP ocorre através da ligação de PIP₂ ao domínio BR, Cdc42-GTP ao domínio GBD, seguido de fosforilação de tirosina na posição 291 (Y291), ligação de Toca-1 e de moléculas adaptadoras à região PPP, o domínio VCA é liberado levando à ramificação e alongamento dos filamentos de actina por Arp2/3. Massaad et al., 2013.

4.4. WASP nas células imunes

Mutações em WASP levam a defeitos celulares que resultam no mau funcionamento da imunidade inata e adquirida, como migração de células, ativação e diferenciação de linfócitos, secreção de citocinas, citotoxicidade celular, apoptose regulada, depuração das células apoptóticas e desregulação da interação célula-célula, figura 3 (9,53,65).

Todas as linhagens derivadas de CTH são funcionalmente anormais em pacientes WAS, incluindo linfócitos, plaquetas, neutrófilos e células dendríticas (32). Em relação aos linfócitos T, pacientes WAS apresentam um número reduzido dessas células na circulação que

diminui gradativamente devido ao aumento da taxa de apoptose (9,65). Além disso, os linfócitos T exibem uma morfologia anormal com redução de microvilos em sua superfície, afetando sua função migratória normal ou seu estado de ativação celular (65,68). A ativação de linfócitos T requer uma estável interação com células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *Antigen-presenting cells*) (9). A interface entre os linfócitos T e as APCs é chamada de sinapse imunológica (SI), composta por uma estrutura rica em filamentos de actina e moléculas sinalizadoras que regula a integração do sinal de receptores de células T (TCR, do inglês *T cells receptors*) e a subsequente ativação dos linfócitos T (69).

Recentemente, foi mostrada a função de WASP na regulação transcricional de células T e células mielóides (70,71). Durante a diferenciação de linfócitos T auxiliares (CD4⁺), WASP promove o aumento da expressão do gene *TBX21*, direcionando as células a uma via de diferenciação para Th1. Em linfócitos T WASP-deficientes, essa diferenciação é desregulada, resultando em um desequilíbrio entre as populações CD4⁺ Th1 e Th2, o que poderia explicar a susceptibilidade dos pacientes WAS a infecções viral e doenças atópicas (53).

Células Treg e linfócitos B podem contribuir com diferentes manifestações autoimunes observadas em pacientes WAS (9,58). As células T reg são responsáveis pela supressão da resposta imune e manutenção da homeostasia imunológica e, embora seu desenvolvimento seja normal em pacientes WAS, estudos *in vitro* mostraram que essas células apresentam uma incapacidade na supressão de linfócitos T efetores e na produção de interferon-gama (IFN- γ) (9,72). Além disso, em camundongos WASP^{-/-} as células T reg apresentam falha na supressão da proliferação de linfócitos B e indução de apoptose devido a uma diminuição na secreção de granzima B (9). Os linfócitos B com ausência de WASP apresentam defeito no citoesqueleto de actina, não produzem filopódios, possuem motilidade

reduzida, apresentam menor capacidade de espalhamento e agregam menos do que células B normais, além de apresentarem uma produção elevada de auto-anticorpos (9).

As células NK (do inglês, *natural killer*) são importantes componentes do sistema imune inato, que atua na eliminação de células infectadas por vírus, de parasitos e células malignas (73). Essas células são predominantemente encontradas no sangue, mas ao serem estimuladas, podem migrar rapidamente para o sítio inflamatório onde matam as células alvo e liberam citocinas para estimular ainda mais a resposta imunológica (74). Ausência de WAS em células NK afeta sua atividade citotóxica, através da redução de sua capacidade de se ligar a células alvo durante a sinapse imunológica (65). Essa diminuição da capacidade das células NK em realizar a lise das células alvo pode estar contribuindo ao desenvolvimento de malignidade observada em pacientes WAS (9,65).

Estudos mostram que plaquetas em pacientes WAS possuem forma e estrutura irregulares, ausência de filopódios, diminuição de filamentos de actina, poucos grânulos- α em seu citoplasma e são metabolicamente menos ativas com capacidade reduzida de agregação (75,76). Apesar do número de megacariócitos na medula óssea de pacientes WAS ser de normal a aumentado e sua capacidade de produzir pró-plaquetas e plaquetas não ser muito afetada, os níveis baixos de plaquetas observados em pacientes WAS, pode ser justificado pelo fato de as plaquetas possuem uma taxa aumentada de depuração na corrente sanguínea, que pode dever-se ao fato de possuírem forma e estrutura anormais, resultando em sua fagocitose por macrófago presentes no baço (77,78).

Os monócitos e macrófagos de pacientes WAS apresentam menos filopódios, um sério defeito na formação de podossomos e polarização celular, além de falha na migração para um gradiente de quimiocinas, apesar de terem uma quantidade normal de receptores de quimiocinas (79,80). Essa falha na migração direcional de macrófagos com WASP ausente, ocorre devido à instabilidade dos filopódios em realizar retração rápida (81). Dessa forma,

falha no rearranjo do citoesqueleto mediado por WASP, seja por sua ausência ou dissociação de WIP, induz uma falha na migração de monócitos e macrófagos para o tecido infectado ou inflamado, assim como, na ligação e fagocitose de antígenos (9).

Os neutrófilos de paciente WAS apresentam incapacidade de adesão, levando a uma falha no rearranjo de suas integrinas de superfície e propagação. Essas células também não conseguem polimerizar a actina e realizar migração normalmente *in vitro* e *in vivo*, desgranular após a estimulação, e possuem uma atividade reduzida da explosão respiratória (9). Além disso, em neutrófilos que apresentam ausência de WASP, a sinalização e ligação de integrinas leucocitárias são severamente diminuídas devido à localização aberrante de integrinas- β 2 (82).

Em relação às células dendríticas, estudos têm mostrado uma distribuição anormal de filamentos de actina e, conseqüentemente, prejuízos na formação de lamelipódios e filopódios, incluindo ainda, redução da mobilidade *in vitro*, possivelmente devido à diminuição no recrutamento de Cdc42 (83,84). Além disso, as células dendríticas de pacientes WAS apresentam capacidade reduzida para a indução de secreção de interferon por células mononucleares de sangue periférico (9,85).

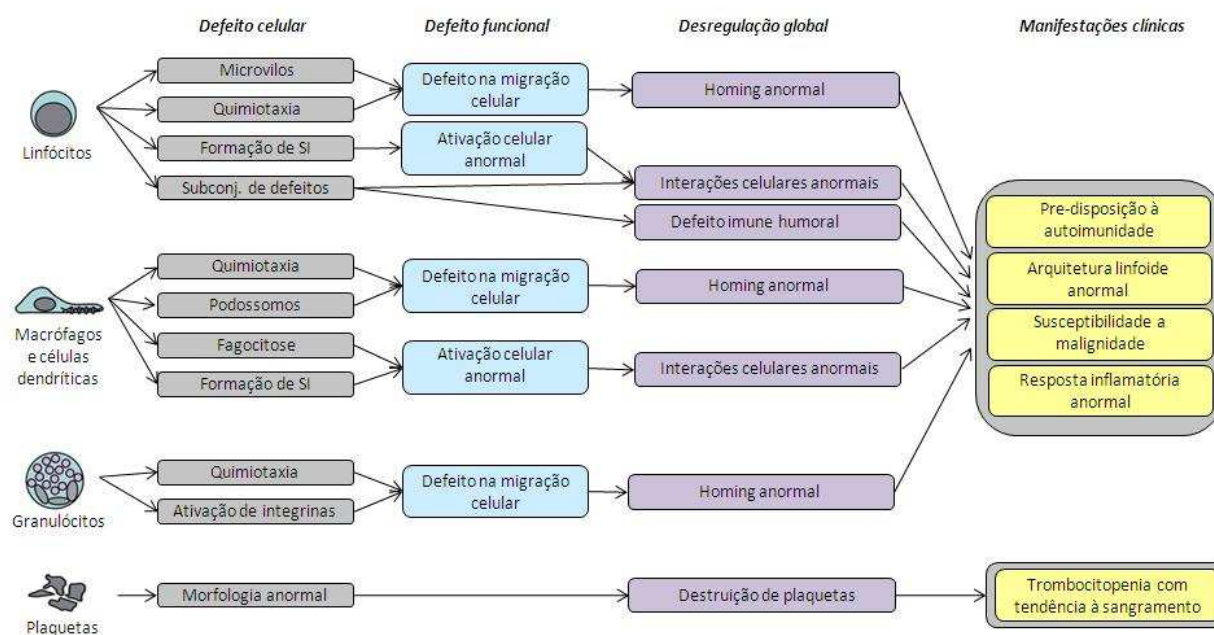


Figura 3. Efeitos da ausência de WASP em múltiplas linhagens hematopoéticas. WASP é requerida para múltiplas funções das células hematopoéticas e sua ausência resulta em desregulação global do sistema imune, com manifestações como, auto-imunidade, anormalidade estrutural das células, susceptibilidade à malignidade e aumento da destruição de plaquetas com tendência a sangramento. Esquema adaptado de Blundell e cols., 2010.

4.5. Transplante de células tronco e progenitoras hematopoéticas

Na década de 60, o transplante alogênico de CTPH começou a ser utilizado para o tratamento de IDP graves e, atualmente, continua sendo o tratamento de escolha (34).

Em 1978, foram realizados, em dois pacientes, os primeiros transplantes de CTPH para tratamento WAS, resultando em cura imunológica e hematológica (86). Atualmente, o transplante de CTPH de doador saudável continua sendo o único tratamento curativo para pacientes WAS, sendo indicado a todos os pacientes com WAS clássica e XLT que possuem doador relacionado (32).

Vários fatores podem influenciar o sucesso do transplante, como a compatibilidade HLA entre doador e receptor; tipo de doador (relacionado vs não-relacionado); idade do

paciente; desenvolvimento de doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) e estado clínico do paciente (87–89).

A literatura mostra que a taxa de sobrevida, pós-transplante, é maior em pacientes com idade menor que 5 anos, alcançando uma sobrevida de até 87% em pacientes com doador relacionado e compatível, e 71% com doador não-relacionado; além disso, pacientes com doadores não-relacionados apresentam maiores chances para o desenvolvimento de DECH aguda, comparado aos pacientes com doador relacionado (32).

Moratto e colaboradores, 2011, mostraram que pacientes WAS com pontuação clínica < 3 apresentam melhor sobrevida e significativamente menores complicações pós-transplante quando comparados ao de pontuação de 3 ou maior, embora não tenha ocorrido diferença entre pacientes com pontuação de 3-4 e aqueles com pontuação 5 (89). Outro fator importante associado ao sucesso do transplante de CTPH para a WAS é o cuidado na escolha do regime de condicionamento. Apesar de dados comparativos publicados até o momento para condicionamento mieloablativo e intensidade reduzida serem contraditórios (89,90). Vários estudos têm mostrado um enxerto completo e durável utilizando um condicionamento de intensidade reduzida tanto com doadores relacionados como não-relacionados (91–93).

4.6. Terapia gênica

Na década de 60, pesquisadores evidenciaram que os vírus possuíam propriedades que os tornavam úteis na entrega de genes em células de interesse, levando a uma publicação, em 1966 por Edward Tatum, em que demonstrava a eficácia dos vírus a serem utilizados na genética das células somáticas e, possivelmente, na terapia gênica (94,95). Com o estabelecimento da tecnologia do DNA recombinante, possibilitando a substituição do gene

causador da patologia viral por gene terapêutico, foi possível a realização da primeira prova de conceito de transferência de genes mediada por vírus (96).

Em 1980, Mercola e colaboradores mostraram que células tronco de medula óssea de camundongos modificadas geneticamente através de transferência de genes, eram capazes de recuperar a medula óssea desses animais (33). Esse resultado encorajou a utilização terapêutica em humanos de células modificadas geneticamente. Com isso, no início da década de 90, acreditando que a correção genética de CTPH autóloga poderia fornecer uma alternativa segura para aqueles pacientes cujas células pudessem ser obtidas, os primeiros ensaios clínicos de terapia gênica para IDP iniciou com o uso do vetor gama-retrovírus derivado de murino para a transferência do gene em pacientes com SCID. No entanto, os benefícios clínicos vieram acompanhados de sérias complicações derivadas do vetor gama-retrovírus, levando a uma evolução do protocolo clínico seguido por progresso biotecnológico resultando em melhorias na capacidade de introduzir genes em CTPH (97–99).

Após ser demonstrada, em modelos animais, a eficácia e viabilidade da terapia gênica para o tratamento de WAS, foi realizado o primeiro ensaio clínico no qual 10 pacientes foram selecionados e tratados com terapia gênica utilizando o vetor γ -retrovírus para a transdução do gene corrigido da WASP em CTPH autogênica (18). Desses pacientes, 9 apresentaram melhora imunológica, com recuperação de células T, NK e plaquetas, e consequente eliminação das complicações associadas à WAS, incluindo infecções, sangramento e autoimunidade (20). No entanto, 7 pacientes demonstraram ativação de oncogenes com subsequente desenvolvimento de leucemia de células T e um paciente desenvolveu síndrome mielodisplásica seguida de leucemia mielóide aguda (20). Dessa forma, visando a eficácia e segurança do uso de CTPH autogênica modificadas geneticamente, estudos começaram a focar na utilização do vetor lentiviral (17,30).

Aiuti e colaboradores (2013) mostraram resultados de três pacientes WAS tratados com terapia gênica utilizando vetor lentiviral. Eles observaram um enxerto durável e estável de CTPH geneticamente corrigida na medula óssea dos pacientes e estabilização das funções da WASP com eliminação dos sintomas clínicos de WAS e, apesar das inserções aleatórias da sequência corrigida no genoma das CTPH, num período de 20 a 32 meses após a correção gênica, não foi observado expansão clonal nesses pacientes (17).

4.7. Sistema CRISPR/Cas

Considerando os avanços na terapia gênica com o uso de CTPH autogênica modificadas geneticamente, o sistema CRISPR/Cas surgiu recentemente, entre 2012-2013, como uma ferramenta de edição gênica de alta precisão capaz de realizar a quebra da fita dupla de DNA de maneira sequência-específica em células de mamíferos (25,100).

O sistema CRISPR em que se utiliza a nucleasse Cas9 guiada por uma molécula de RNA, composta de 100 nucleotídeos únicos, é considerado como sistema CRISPR do tipo II, sendo o mais estudado atualmente. A Cas9 possui dois sítios catalíticos, RuvC e HNH, que são ativados após o reconhecimento da sequência PAM à região alvo (29). O *locus* alvo, ao ser clivado pela Cas9, sofre uma das duas principais vias de reparo de DNA: a recombinação não-homóloga (NHEJ, do inglês *nonhomologous end joining*) ou a recombinação homóloga (HDR, do inglês *homology-directed repair*) (29). Na ausência de uma sequência doadora corrigida, as fitas de DNA são re-ligadas através da via NHEJ, que pode levar a mutações em forma de inserção/deleção (indel), podendo esse mecanismo ser aproveitado para mediar a inativação de genes específicos (29,101). Na presença de uma sequência doadora corrigida, a via HDR, que ocorre em menor frequência que a NHEJ, pode ser alavancada para a modificação do *locus* alvo (29).

O sistema CRISPR/Cas9, devido à simplicidade e custo, comparando com outras plataformas de edição gênica, já tem sido bastante utilizado como uma ferramenta de pesquisa, sendo atualmente sua aplicação direcionada à biotecnologia e medicina, para o tratamento de desordens genéticas, no que diz respeito à saúde humana (102). Dessa forma, a aplicação de CRISPR/Cas9 pode ser dividida em cinco grupos: 1) modificação genômica mediada Cas9 inata; 2) modificação genômica mediada Cas9 mutada; 3) ativação ou inativação de controle transcricional mediada por Cas9; 4) modificação do genoma de alto rendimento e silenciamento e 5) separação de certas áreas genômicas utilizando Cas9 com sítios catalíticos inativos unidos a um marcador (103).

Estudos em células ou animais têm mostrado que o sistema CRISPR/Cas representa um avanço significativo na terapia gênica porque demonstraram a capacidade de ser administrado *in vivo* por métodos que são potencialmente traduzíveis para uso humano (25,49,104). Entretanto, considerando o uso clínico como aplicação final, pesquisadores têm focado em ultrapassar obstáculos ainda existentes, como efeitos fora do alvo (*off-target*), eficácia e desenvolvimento de métodos *in vivo* de entrega do gene corrigido, eficácia da HDR, potencial imunogênico do veículo de entrega e capacidade das células editadas (105).

Diferentes protocolos têm sido desenvolvidos para a detecção de efeitos *off-target* da nucleasse Cas9 no genoma de células (106–111). Embora ainda seja necessária a padronização dos métodos de otimização, esses protocolos, para identificação de potenciais sítios *off-target*, associados a ferramentas computacionais utilizadas para desenhar RNA guia, são capazes de prever a eficácia do sistema CRISPR/Cas (111). Para aumentar a eficácia de edição via HDR, Yu e colaboradores, em 2015, mostraram que pequenas moléculas, como brefeldina A e L755507, são capazes de modular a atividade do sistema CRISPR/cas, aumentando efetivamente a atividade de reparo via HDR na presença de uma sequência doadora (112).

Em outubro de 2016, um grupo chinês, liderado pelo oncologista Lu You da Universidade de Sichuan em Chengdu, China, realizou o primeiro ensaio clínico utilizando o sistema CRISPR/Cas para o tratamento de câncer de pulmão agressivo através de injeção de células editadas. Os pesquisadores coletaram células imunes do sangue do paciente e silenciaram, utilizando o sistema CRISPR/Cas9, o gene que codifica a proteína PD-1, que normalmente bloqueia a resposta imune favorecendo a proliferação de células cancerígenas. Após o cultivo das células editadas, aumentando seu número, as células foram injetadas de volta no paciente, com a esperança de que com a ausência da proteína PD-1, as células editadas pudessem atacar as células cancerígenas. Lu diz que o tratamento correu bem, e que o participante deverá receber uma segunda injeção de células editadas, no entanto, por questões de confidencialidade do paciente, não foi possível dar maiores detalhes (113).

5. MATERIAIS E MÉTODO

Os métodos foram realizados no Laboratório de Alta Complexidade do IFF e no Laboratório do Programa de Carcinogênese Molecular do Centro de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (INCA).

5.1 Amostra

Para a avaliação da eficácia do sistema CRISPR/Cas, foram utilizadas células mononucleadas de sangue periférico (PBMC, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*) humano de doador saudável e linhagens humanas, como a de rim de embrião humano (HEK 293) e de linfócitos T derivados de leucemia/linfoma de células T do adulto (Jurkat). As CTPH CD34⁺ de sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) foram utilizadas para

avaliação da capacidade dessas células em incorporar material genético exógeno por método não-viral (eletroporação), mantendo sua capacidade proliferativa.

5.2 Cultivo celular

As células HEK 293 foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco®), as PBMC e Jurkat foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco®), ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino inativado, L-glutamina (2mM) e antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100µg/mL). As CTPH CD34⁺ obtidas de sangue de cordão umbilical, foram eletroporadas logo após o protocolo de purificação. Após a eletroporação, as células foram plaqueadas em duas concentrações diferentes, 5×10^2 e 2×10^3 células por poço. As células foram concentradas em 300 µL de meio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium®) e adicionadas em uma concentração de 1,1X em meio de cultura Methocult® H4034 (Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada), então sedimentadas em dois poços de uma placa de 6 poços, 1,1 mL/poço para cada ensaio. Todas as células em cultura foram mantidas em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°C e com saturação de umidade.

As PBMCs em cultura foram estimuladas, 24 horas após transfecção, com beads de ativação de linfócitos T humano CD3/CD28 (Gibco® Dnybeads®) e mantidas em cultura com meio acrescido de IL-2 (30 U/mL) para expansão de linfócitos T.

5.3 Cultura primária

5.3.1 PBMC

As PBMCs foram obtidas a partir de lavagem com solução tampão (PBS, do inglês Phosphate Buffer Solution), pH 7,2, de filtro, 24 horas após coleta de sangue de doador saudável proveniente do Banco de Sangue do INCA. Após lavagem do filtro com solução tamponada, as células mononucleadas em suspensão, coletadas em tubo de 50 mL, foram separadas por gradiente de densidade Ficoll-Hypaque[®] 1077, após centrifugação de 890 G por 20 minutos. A camada correspondente às células mononucleadas fora coletada com auxílio de pipeta pauster e transferida para um tubo de 15 mL seguido de três lavagens com PBS e contagem do número de células para uso em transfecção.

5.3.2 CTPH CD34⁺

5.3.2.1. Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão e exclusão no que diz respeito à captação e triagem de gestantes para coleta de SCUP utilizadas de banco de sangue de cordão umbilical e placentário do INCA (BSCUP/INCA) estão de acordo com os estabelecidos por normas regulamentadoras e órgãos acreditadores. E no que diz respeito ao processamento para redução de volume das unidades de SCUP coletadas, é definido pelo BSCUP que estarão qualificadas as unidades que tiverem número de células nucleadas totais (CNT) igual ou superior à $1,5 \times 10^9$. Assim, no presente projeto, utilizamos como critério de inclusão as bolsas desqualificadas pelo BSCUP por baixa celularidade, ou seja, as unidades de SCUP que apresentarem CNT inferior a $1,5 \times 10^9$ e como critério de exclusão, foram utilizados os mesmos estabelecidos pelo BSCUP, que são: bolsa aberta pré-processamento; bolsa rompida na selagem ou na centrifugação; transporte inadequado e tempo entre coleta e processamento superior a 48 horas.

5.3.2.2. Coleta de SCUP

A coleta de SCUP foi realizada pela equipe de enfermagem do BSCUP, quando em maternidades conveniadas (Hospital Naval Marcílio Dias, Hospital Maternidade Maria Amélia Buarque de Hollanda, Maternidade escola UFRJ e Hospital Maternidade Carmela Dutra) ou por obstetra responsável pelo parto quando em maternidades não-conveniadas. A coleta do SCUP foi realizada extra-útero, logo após o parto, através do efeito da gravidade, sendo o SCUP transferido para uma bolsa estéril contendo 30 ml da solução anticoagulante CPDA1. A unidade de SCUP coletada foi mantida a uma temperatura de 4°C até a realização do processamento, não ultrapassando o período máximo de 48h após a coleta.

5.3.2.3. Processamento

O protocolo de processamento utilizado no BSCUP é padronizado para a rotina do Centro de Transplante de Medula Óssea do INCA. O processamento das unidades de SCUP consistirá em redução do volume através da eliminação de plasma e hemácias realizado por sistema automatizado SEPAX 2[®] (Biosafe, Eysins Switzeland).

5.3.2.4. Purificação de CTPH

As CTPH foram purificadas, por seleção positiva de células CD34⁺, a partir de concentrado de células mononucleadas de SCUP isoladas após etapa de redução de volume, seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante, Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, Canadá. O protocolo de purificação de CTPH se deu em 2 etapas. A primeira, através da utilização do kit RosetteSep para enriquecimento das CTPH em gradiente de densidade,

seguido de um kit de purificação em tubos de 15 mL e magneto para isolamento de células positivas para o marcador CD34.

5.4 Desenhos da sequência doadora *GFP/WAS* e RNAg

Os desenhos tanto da sequência de modificação gênica associada ao gene repórter *GFP* (*GFP-WAS*), como dos RNAg foram realizados segundo algoritmos descritos em <http://www.genome-engineering.org>. Utilizando ferramentas computacionais como DNA 2.0 e ZhangLab, foram demonstrados 100% de homologia da sequência desenhada com o gene *WAS*.

A sequência doadora foi desenvolvida a partir de DNA complementar (cDNA) do gene *WAS* fusionado à *GFP*, com regiões flanqueadoras 3' e 5' (braços de homologia) contendo aproximadamente 800 pares de bases (pb), as quais apresentam homologia para o gene *WAS*. Na sequência doadora, foi realizado otimização de códons, sem alterações de aminoácidos, na região de possível reconhecimento pelo RNAg para que não ocorresse a clivagem do DNA não genômico pela Cas9.

Como na síndrome de *WAS* a mutação pode ocorrer em qualquer um dos 12 exons do gene *WAS*, a região determinada para inserção da sequência doadora precisaria ser antes do início do exon 1. A clivagem da fita dupla de DNA pela endonuclease Cas9 ativa na célula a via HDR, levando ao reconhecimento dos braços de homologia da sequência doadora *GFP-WAS*, sendo o braço de homologia 5' se anelando à região não codificante (UTR, do inglês *Untranslated region*) e o braço 3' se anelando por todo o exon 1 e parte do exon 2 do gene *WAS*. Logo após o anelamento dos braços de homologia ao gene *WAS*, a sequência *GFP/WAS* formará uma estrutura em forma de alça. Além disso, foi adicionado à sequência doadora, a

enzima de restrição XbaI no início e ao final da sequência correspondente a GFP, para retirada opcional deste como ilustrado na figura 4 e detalhado no apêndice I.

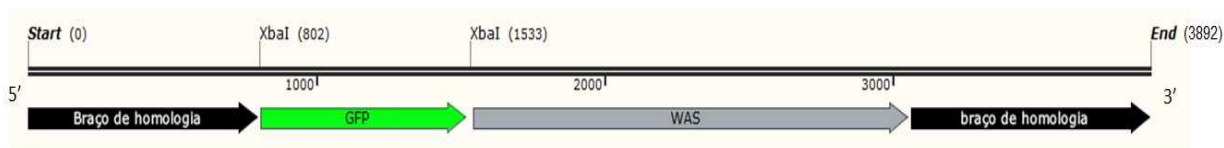


Figura 4. Sequência doadora *GFP/WAS*. A sequência doadora possui um tamanho de 3892 pb e 239 aminoácidos, sendo composta de: um braço de homologia 5' com 800 pb, seguido do gene repórter *GFP* adicionado da enzima de restrição *XbaI* em suas extremidades, que antecede o DNA complementar do gene *WAS*, composto apenas de seus exons, flanqueado ao braço de homologia 3' com 827 pb.

A especificidade da endonuclease Cas9 é determinada pela sequência guia contendo 20 nucleotídeos (nt). No sistema CRISPR derivado da bactéria *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*), como o utilizado no presente estudo, os 20-nt guia desenhados devem preceder uma curta sequência determinada como motivo protoespaçador adjacente (PAM) composto por 5'-NGG. Portanto, para o desenho da sequência guia, foram considerados: **1)** o sítio alvo no DNA genômico, que para o presente estudo foi a cerca de 20-30 pb do início do exon 1 do gene *WAS*; **2)** o 5'-NGG PAM para Cas9 *S. pyogenes* (SpCas9) e **3)** a probabilidade de efeitos *off-target*, como o anelamento da sequência guia em locais não previstos no genoma da célula. Assim, através das ferramentas computacionais utilizadas, DNA 2.0 e ZhangLab, foram obtidas duas sequências guias, ambas apresentando 100% de homologia para a região alvo e baixo score no algoritmo preditor de efeitos *off-target*. Portanto, no estudo, foram avaliados a eficácia na edição gênica de cada uma das sequências guias desenhadas, denominadas de RNAg 1 e RNAg 2, ilustrado na figura 5.



Figura 5. Sequências guias. As ferramentas DNA 2.0 e ZhangLab foram as que melhor atenderam os requisitos necessários, fornecendo duas sequências de 20 nucleotídeos associadas a sequências PAM.

5.5 Plasmídeos

A sequência *GFP/WAS* foi sintetizada e inserida no plasmídeo pUC57-simples pela empresa GenScript (Piscataway, NJ, USA). Os plasmídeos, pX459 (pSpCas9(BB)-2A-Puro v2.0, addgene) e pX458 (pSpCas9(BB)-2A-GFP, addgene) foram utilizados para o processo de clonagem das sequências de RNAg, previamente desenhados. Após a etapa de anelamento dos pares de oligonucleotídeos, as sequências foram ligadas no sítio de clonagem em cada um dos plasmídeos, como o pX458 (contendo o gene que codifica GFP) e pX459 para o RNAg validado, ambos utilizando a enzima de restrição BbsI. Para a inserção de *GFP/WAS* em pUC 57-simples foi utilizado a enzima de restrição EcoRV.

5.6 Clonagem

Cada plasmídeo, pX458 e pX459, foi inserido, separadamente, em bactérias competentes, *E. coli* TOP-10f por choque térmico (invitrogen Life Science) ou HD5 α [®], através de processo de transformação bacteriana. As bactérias transformadas foram cultivadas em placa contendo meio Luria Bertani (LB)-ampicilina-ágar por 16 horas em estufa a 37°

onde foram formadas colônias cujas bactérias apresentavam resistência, fornecida pelo plasmídeo, ao antibiótico ampicilina. Para a amplificação de uma pequena massa de DNA plasmidial, as colônias bacterianas isoladas foram selecionadas da placa e crescidas em 5 mL de meio LB líquido acrescido de ampicilina (2 µg/mL), durante 16 horas, sob agitação a 250 rpm. Em seguida, com o objetivo de purificar o DNA plasmidial, foi realizada uma mini-preparação plasmidial, seguindo protocolo estabelecido pelo kit Illustra plasmidPrep Mini Spin (GE Healthcare Life Science).

As etapas subsequentes consistiram em avaliar a sequência de nucleotídeos que compunham o DNA plasmidial para a confirmação da presença da sequência de interesse, RNAg, através da técnica de sequenciamento e, após a confirmação, foi realizada a amplificação de uma grande quantidade de DNA plasmidial através do cultivo dessas bactérias em 500 mL de meio Terrific Broth (TB) líquido acrescido de ampicilina (2 µg/mL) durante 16 horas, sob agitação a 250 rpm, para então ser realizada a purificação de uma grande quantidade de DNA plasmidial através de uma maxi-preparação plasmidial, utilizando protocolo estabelecido pelo kit de purificação plasmidial Maxi-Prep Quiagen® (Quiagen, Hilden - Alemanha).

Do plasmídeo pUC 57-simples recombinante contendo a sequência doadora *GFP/WAS* sintetizada, foi realizado o protocolo de maxi-preparação plasmidial, utilizando kit de purificação plasmidial Maxi-Prep Quiagen®.

5.7 Digestão enzimática de DNA plasmidial

As digestões foram realizadas, em geral, utilizando 1 µL de DNA (600 ng), 0,2 µL de enzima de restrição escolhida, 10 U/µL de tampão específico para a enzima de restrição escolhida e água mili-Q para completar o volume para 20 µL. A amostra foi incubada a 37 °C

por um tempo mínimo de 3 horas. Após o período de incubação foi realizado eletroforese em gel de agarose para análise da amostra digerida.

Enzimas de restrição	Tampão (10 X concentrado)	Objetivo
EcoRI	CutSmart	Digestão do plasmídeo pX459
EcoRV	3.1	Digestão do plasmídeo pX459
NdEI	CutSmart	Digestão do plasmídeo pX459
XbaI	Tango	Digestão do plasmídeo pUC57-simples

Tabela 1. Enzimas e respectivos tampões utilizados na digestão.

5.8 Reação em cadeia por polimerase (PCR)

A reação em cadeia por polimerase convencional foi realizada com o objetivo de amplificar uma determinada sequência de DNA, seja para análise qualitativa para confirmação da clonagem, como para clonagem dos amplicons em plasmídeo específico. Todas as reações em cadeia por polimerase foram realizadas em termociclador Veriti, Applied Biosystems e confirmadas por eletroforese em gel de agarose.

Para cada objetivo foram utilizados iniciadores (primers) específicos, como descritos na tabela abaixo:

Primer	Sequencia (5' - 3')	Objetivo
U6 - Senso	GACTAATCATATGCTTACCGT	Amplificar plasmídeo pX458 ou pX459
459 - Reverso	TGGAAAGTCCCTATTGGCGT	Amplificar sequência reverso complementar do plasmídeo pX458 ou pX 459
RNAg - Senso	GAGATGGGCCCCAGAGAGTA	Amplificar região de edição pela Cas9
RNAg - Reverso	ACCAAGCATTTCGTCCAAGC	Amplificar sequência reverso complementar da região de edição pela Cas9
M13 - Senso	GTAAAACGACGGCCAGT	Amplificar plasmídeo CR2.1 TOPO
M13 - Reverso	CAGGAAACAGCTGTAAC	Amplificar sequência reverso complementar do plasmídeo CR2.1 TOPO
GFP/WAS 1 - senso	AAAAGTAATTTGGGAGCTGCGG	Amplificar extremidade 5' da sequência doadora <i>GFP/WAS</i>
GFP/WAS 1 - Reverso	GTGCAGATGAACTTCAGGGTC	Amplificar sequência reverso complementar extremidade 5' da sequência doadora <i>GFP/WAS</i>
GFP/WAS 2 - senso	CTGACCTTGTCCTTGTGGTT	Amplificar extremidade 3' da sequência doadora <i>GFP/WAS</i>
GFP/WAS 2 - Reverso	GGTTCAGGTACAAATACAGTGCTC	Amplificar sequência reverso complementar extremidade 3' da sequência doadora <i>GFP/WAS</i>

Tabela 2. Sequência de pares de primers (senso e reverso) para clonagem de RNAg, análise de região editada pela Cas9 e clonagem em vetor linearizado.

Para cada objetivo da aplicação da técnica de PCR, foi utilizado um determinado protocolo de ciclagem:

Protocolo 1 Amplificação de sequência do plasmídeo pX458 ou pX459

94 °C por 30 segundos (desnaturação)	} 35 ciclos
58 °C por 30 segundos (anelamento)	
72 °C por 30 segundos (extensão)	

Ao final, 4 °C por tempo indeterminado

Protocolo 2 Amplificação de região editada pela Cas9

Desnaturação inicial a 95 °C por 2 minuto

95 °C por 15 segundos (desnaturação) }
60 °C por 30 segundos (anelamento) } 30 ciclos
72 °C por 1 minutos (extensão) }

72 °C por 7 minutos (extensão final)

Ao final, 4 °C por tempo indeterminado

Protocolo 3 Amplificar sequência do plasmídeo CR2.1 TOPO

Desnaturação inicial a 95 °C por 5 minuto

94 °C por 15 segundos (desnaturação) }
56 °C por 30 segundos (anelamento) } 35 ciclos
72 °C por 1 minutos (extensão) }

72 °C por 7 minutos (extensão final)

Ao final, 4 °C por tempo indeterminado

Protocolo 4 Amplificar sequência doadora *GFP/WAS* inserida no DNA genômico

Desnaturação inicial a 95 °C por 5 minuto

94 °C por 15 segundos (desnaturação) }
55 °C por 30 segundos (anelamento) } 30 ciclos
72 °C por 1 minutos (extensão) }

72 °C por 7 minutos (extensão final)

Ao final, 4 °C por tempo indeterminado

5.9 Eletroporação

Os plasmídeos recombinantes foram transfectados nas células através da técnica de eletroporação, seguindo o protocolo descrito por Chicaybam e colaboradores (114).

Para a avaliação da eficácia da Cas9 em clivar o sítio alvo, um total de 8×10^5 células HEK foram eletroporadas com 5 μg do plasmídeo pX458 recombinante, contendo 5 μg de RNAg 1 ou RNAg 2. Para a transferência gênica de *GFP/WAS*, 5 μg dos plasmídeos recombinantes pX459 contendo RNAg previamente validado e pUC57 contendo a sequência doadora *GFP/WAS* foram co-eletroporados em PBMC (1×10^7) e Jurkat (1×10^6). As células foram ressuspensas em 100 μL de solução tampão de eletroporação específica, 1S para HEK e 1SM para PBMC e Jurkat, pré-aquecida, desenvolvida por Chicaybam e colaboradores (30) e colocadas em cubeta estéril (Mirus Biotech[®], Madison, WI, EUA cat.: MIR 50121). A eletroporação foi realizada através do sistema Lonza[®] Nucleofector Iib[®]. Após a eletroporação, as células foram gentilmente ressuspensas em 1 mL de meio DMEM ou RPMI suplementado com 2 mM de L-Glutamina e 20% de soro fetal bovino (SFB).

5.10 Extração e purificação de DNA

5.10.1 Extração e purificação por kit

Para as amostras purificadas por citometria de fluxo, devido ao pequeno número de células (10^5 - 10^7), o DNA foi extraído segundo protocolo do kit de extração de DNA genômico AccuPrep (Bioneer).

Produtos de PCR foram purificados, seguindo protocolo do kit de purificação PureLink[®] (Invitrogen, Life Technologies).

5.10.2 Extração por fenol/clorofórmio

Para um número de células maior que 10^7 , a extração de DNA foi realizada por fenol/clorofórmio. Assim, foi adicionado ao concentrado de células 200 μL de tampão troteínase K, RNase A (8 μL) para remoção de RNA, proteínase K (8 μL) para a desnaturação protéica, seguindo, após mistura por inversão (5-10 vezes), incubação a 55 °C por 3 horas ou overnight. Após o período de incubação, foi adicionado à mistura, 300 μL fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), misturado gentilmente por inversão (1-2 minutos), centrifugado à 10.000 rpm (microcentrífuga SpinLab, modelo SL-5F) por 5 minutos. A fase superior aquosa, contendo o DNA, foi recuperado e transferido para um tubo de coleta, repetindo a etapa de adição de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, mistura e centrifugação. Novamente a fase superior aquosa foi recuperada e transferida para outro tubo de coleta e, em seguida, foi adicionado 300 μL clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), sendo misturado, centrifugado e coleta da fase superior como na etapa anterior. Após essas etapas de limpeza, o DNA foi precipitado, em 1/10 do volume de amostra, com acetato de potássio 3M, pH 5,2 e 2,5 vezes do volume de amostra, com etanol 95% gelado. A mistura foi incubada no gelo por no mínimo 20 minutos, centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C sendo o sobrenadante descartado e, o concentrado, lavado com 1 mL de etanol 70%.

Após a retirada do etanol 70% por centrifugação, 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C, a amostra foi deixada secar em temperatura ambiente, e o precipitado contendo o DNA, foi ressuspensão em 50 μL de água Mili-Q.

5.11 Clonagem de produto de PCR em vetor pCR2.1 TOPO

Os produtos de PCR, do DNA extraído das células GFP⁺ purificadas após transfecção, foram clonados em vetor linearizado pCR2.1 TOPO, segundo protocolo estabelecido pelo fabricante Invitrogen (TOPO TA cloning Kit). Após clonagem, as amostras foram transformadas em bactérias E. coli TOP-10f (Invitrogen Life Science) ou HD5 α [®] competentes e cultivadas em placa contendo meio LB-ampicilina-ágar por 16 horas em estufa a 37° onde foram formadas colônias que continham a sequência amplificada.

5.12 PCR de colônia

O PCR de colônias consistiu em uma reação de PCR de cada colônia bacteriana, com a finalidade de rastrear as colônias que continham a sequência de interesse para análise. Portanto, após o cultivo de bactérias transformadas, as colônias foram retiradas das placas com o auxílio de uma ponteira e colocadas em microtubos de 2,0 mL contendo 50 μ L de resina quelante chelex 10% e incubadas à 95 °C por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 12 rpm (microcentrífuga SpinLab, modelo SL-5F) por 1 minuto, dessas amostras, 5 μ L foram adicionados ao mix de reação de PCR e seguindo para termociclador com o protocolo 3 de ciclagem descrito anteriormente.

Segue descrição do mix de reação de PCR para um volume de 25 μ L por reação:

- 0,4 μ L de enzima Taq Platinum 5U/ μ L
- 2,5 μ L tampão 10X
- 0,75 μ L MgCl₂ (50 mM)
- 0,5 μ L mistura de dNTP (25 mM)
- 0,5 μ L primer senso (10 μ L)
- 0,5 μ L primer reverso (10 μ L)
- 14,85 μ L de água mili-Q estéril

5.13 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado pela Plataforma de Tecnológica da FIOCRUZ (RPT01A - Sequenciamento de DNA – RJ - IOC) ou na plataforma de sequenciamento do Instituto nacional de Câncer – Coordenação de Pesquisa – programa de Genética.

5.13.1 Reação de sequenciamento

As amostras de DNA, previamente purificadas, foram distribuídas em placa de 96 poços numa quantidade equivalente a 5-20 ng. Para cada amostra de DNA sequenciada, foram adicionados 3,2 pmol/ μ L de iniciadores (primers), 1 μ L de “BigDye” (deoxinucleotídeos, dideoxinucleotídeos fluorescentes, enzima TAQ DNA polimerase - Applied Biosystems), 2 μ L de tampão de diluição do “BigDye” (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5mM de cloreto de magnésio - Applied Biosystems) e água milliq totalizando um volume final 10 μ L por poço. A placa foi coberta com adesivo ou a tampa de borracha da Axygen (AxyMat), centrifugada rapidamente (spin) a placa e seguiu para reação de polimerase em cadeia com o protocolo de ciclagem descrito abaixo:

Desnaturação inicial a 96 °C por 1 minuto

96 °C por 15 segundos (desnaturação)	} 40 ciclos
55 °C por 15 segundos (anelamento)	
60 °C por 4 minutos (extensão)	

Ao final, 4 °C por tempo indeterminado

5.13.2 Precipitação da reação de sequenciamento

Após a ciclagem da reação de sequenciamento e uma breve centrifugação, as amostras presentes na placa passaram por um processo de precipitação, que consistiu em: adicionar 2,5 μL de EDTA e 30 μL de etanol 100%, mantendo em seguida, a placa em repouso no freezer por 15 minutos sob abrigo da luz. Após centrifugação por 45 minutos a 1650 G a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70% e, em seguida, centrifugado por 15 minutos a 1650 G a 4 °C. Então, o etanol foi totalmente removido por centrifugação, com a placa invertida e apoiada em papel absorvente. O precipitado foi incubado a 60 °C por 10 minutos sob abrigo de luz.

Tão logo o término da precipitação, a placa contendo as amostras foi encaminhada à plataforma de sequenciamento.

5.14 Purificação de células por citometria de fluxo

Após eletroporação, para análise do DNA das células positivas para GFP, essas foram purificadas por citometria de fluxo (FACS, do inglês *Fluorescence-activated cell sorting*) utilizando o equipamento MoFlow ASTRIOS (Beckman Coulter), na Plataforma Multiusuários de Citometria de Fluxo da Fiocruz ou o equipamento FACS Aria (BD Bioscience) na Plataforma de Citometria de Fluxo do Centro Nacional de Bioimagem (CENABIO) da UFRJ.

A purificação das células foi realizada de maneira estéril no terceiro dia após a transfecção pelo método de eletroporação.

5.15 Citometria de fluxo

O ensaio por citometria de fluxo foi realizado através do equipamento Accuri[®] C6, Accuri Cytometer ou Attune[®], Applied Biosystems, na avaliação da expressão de GFP em células transfectadas. Dessa forma, foi possível quantificar a eficiência de transferência gênica de *GFP/WAS* por recombinação homóloga.

6. RESULTADOS

6.1 Construção e clonagem

6.1.1 Sequência doadora *GFP/WAS*

A sequência doadora *GFP/WAS*, considerando os braços de homologia, o gene repórter GFP e o mini gene *WAS*, contém um tamanho de 3892 pb, foi sintetizada e inserida no sítio de clonagem do plasmídeo pUC 57 utilizando a enzima de restrição *EcoRV*, como mostrado na figura 6.

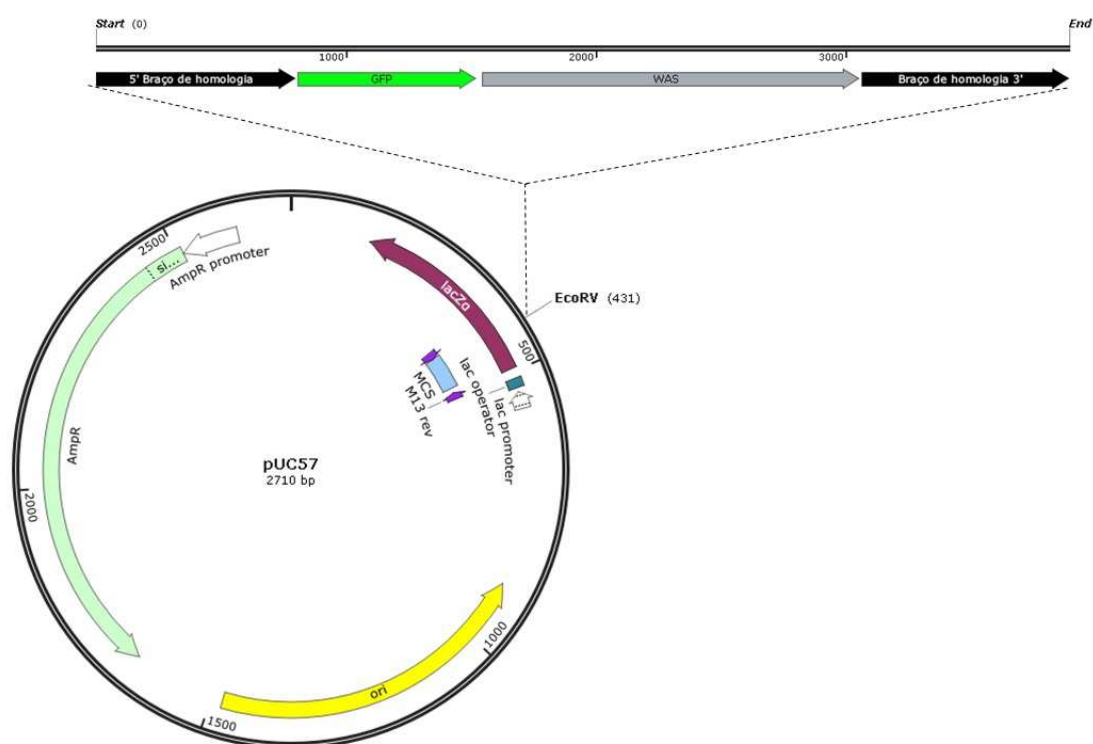


Figura 6. Sequência doadora *GFP/WAS* sintetizada. A inserção da sequência doadora completa foi realizada pelo sítio de clivagem presente no plasmídeo pUC57 simples. O plasmídeo pUC simples é composto pelos gene de resistência à ampicilina (*AmpR*) e operon *Lac Z* (*lacZα*), seguidos de seus promotores, assim como origem de replicação (*ori*) e sítio múltiplo de clonagem

(MCS) com iniciadores (primers) de sequências comuns (M13 senso e reverso – indicados pelas setas violeta).

A presença de *GFP/WAS* no plasmídeo foi avaliada por análise eletroforética em gel de agarose 0,8% do DNA plasmidial digerido com a enzima de restrição *Xba*I. A análise eletroforética mostrou a presença de DNA com peso molecular compatíveis ao tamanho de fragmentos esperados após a digestão indicando o sucesso da técnica de recombinação utilizada. Após a digestão do DNA plasmidial, foram gerados 3 fragmentos, um de 731 pb, um de 808 pb que, devido ao peso molecular aproximado, não foi possível distinguir as bandas, e outro fragmento de 5063 pb, como mostrado na figura 7.

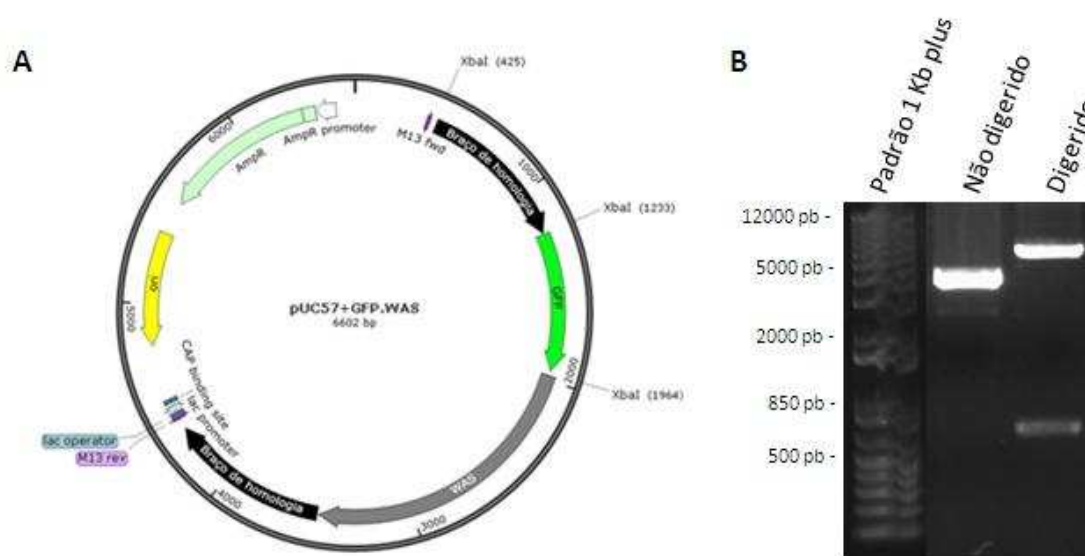


Figura 7. Digestão enzimática de DNA plasmidial recombinante contendo *GFP-WAS*. (A) Após a ligação da sequência doadora completa, o DNA plasmidial foi digerido, utilizando a enzima de restrição *Xba*I gerando 3 fragmentos. (B) Na análise eletroforética em gel de agarose 0,8%, foi possível observar, uma banda única do plasmídeo não digerido, duas bandas no plasmídeo digerido e no controle negativo, nenhuma banda foi formada.

6.1.2 Sistema CRISPR/Cas9

Na WAS, a mutação pode ocorrer em qualquer um dos 12 exons do gene *WAS*, dessa forma, a região de edição gênica se dará pela clivagem da fita dupla de DNA através dos sítios catalíticos da endonuclease Cas9, que são ativados após o reconhecimento da sequência PAM à região alvo, nesse caso, a cerca de 20-30 pb do início do exon 1, como mostrado na figura 8.

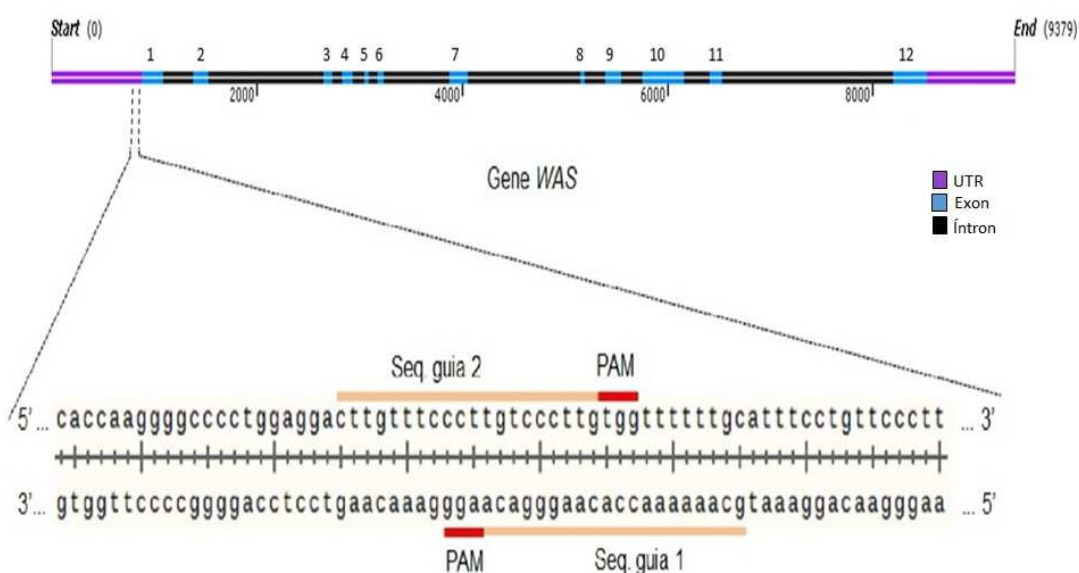


Figura 8. Seleção da região alvo. Sequência guia para a clivagem do DNA pela Cas9 apresenta homologia para região que precede o início do exon 1, região não transcrita (UTR, do inglês Untranslated Region) do gene WAS.

Para cada uma das sequências guias, os pares de oligonucleotídeos correspondentes aos 20 nt, foram anelados e ligados ao sítio de clonagem no plasmídeo pX458 ou pX459 através do reconhecimento das extremidades coesivas proporcionado pela enzima de restrição BbsI. Tanto o plasmídeo pX458 como o pX459, além de apresentarem os genes de resistência aos antibióticos ampicilina e puromicina, também apresentam, seguido ao sítio de clonagem,

o gene que codifica a Cas9 e a sequência invariável transcRNA que compõe o RNAg, cuja transcrição é proporcionada pelo promotor U6, figura 9.

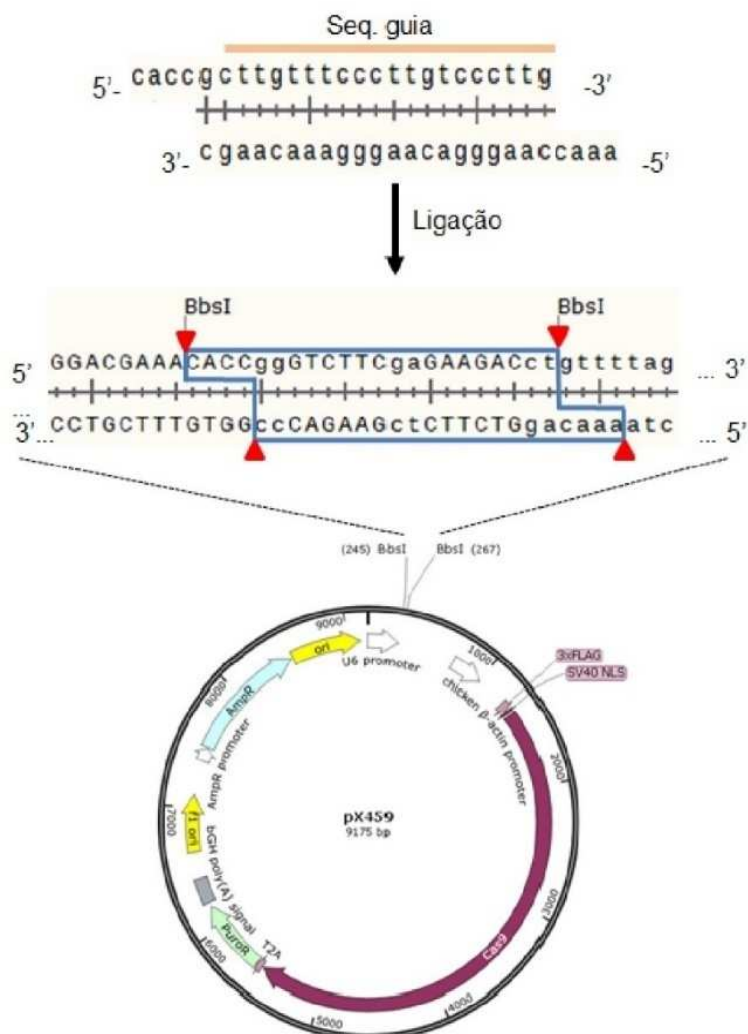


Figura 9. Inserção da sequência guia no vetor plasmidial. Cada par de oligonucleotídeos correspondentes aos 20 nt das duas sequências guias foram anelados e então ligados ao sítio de clonagem no plasmídeo pX459 ou pX458 através de anelamento das extremidades coesivas proporcionadas pela enzima de restrição BbsI.

As etapas subsequentes consistiram em confirmar a presença da sequência guia no plasmídeo. Uma reação de polimerase em cadeia (PCR), utilizando iniciadores de transcrição

(primer) U6 e 459, foi realizada gerando amplicons de 360 pb. As sequências de nucleotídeos desses amplicons foram analisadas pela técnica de sequenciamento para a confirmação da presença da sequência guia previamente desenhada, como mostra análise de eletroferograma da figura 10. E, após confirmação da clonagem, foi realizada a amplificação de uma grande quantidade desse plasmídeo híbrido através da técnica de maxi-preparação plasmidial.

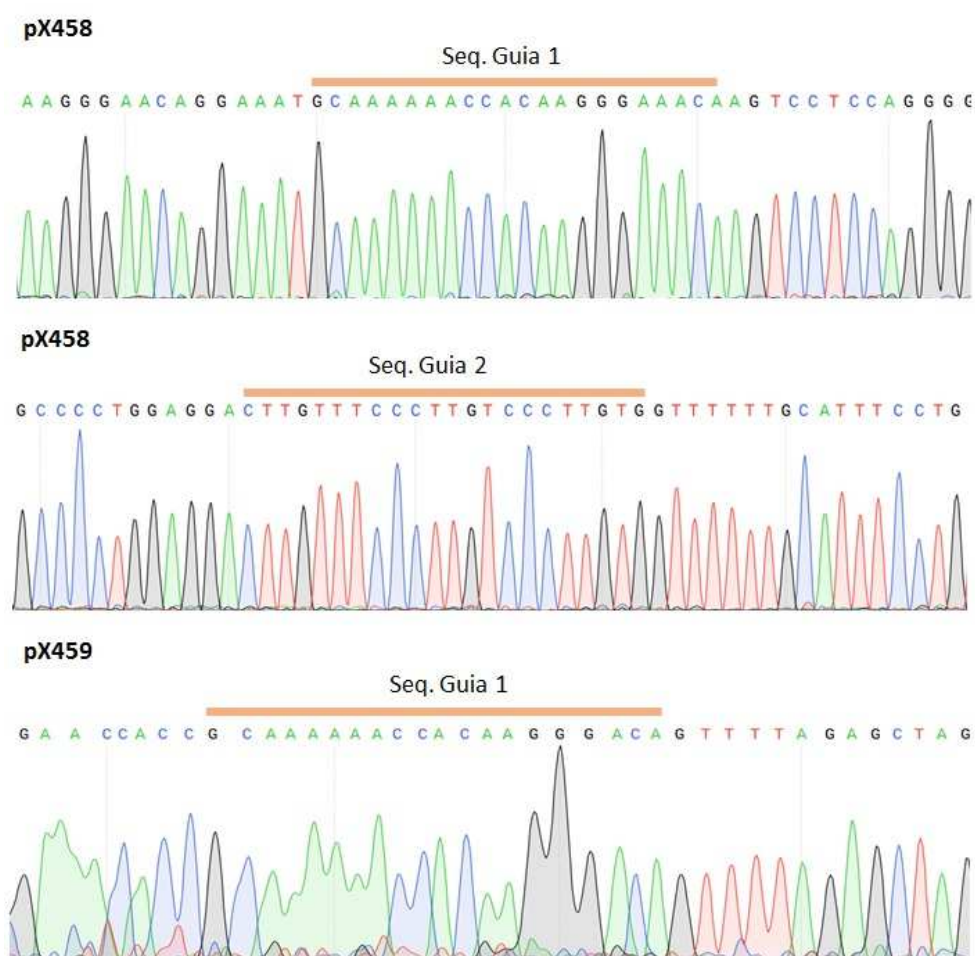


Figura 10. Eletroferograma. Análise das sequências de nucleotídeos do DNA plasmidial, confirmando a inserção da sequência guia, correspondente ao RNAg 1 ou RNAg 2 no plasmídeo pX458 e a sequência correspondente ao RNAg 1 no plasmídeo pX459.

6.2 Validação funcional dos RNAg: transfecção e cultura de células HEK 293

A avaliação da eficácia da Cas9 guiada assegura a confiabilidade dos resultados obtidos na edição gênica sítio-dirigida através da inserção de uma sequência doadora corrigida. Portanto, o plasmídeo pX458, expressando o gene repórter GFP, contendo o RNAg 1 ou RNAg 2 foram transfectados por eletroporação em células HEK 293. As células HEK, tem se consolidado em nosso grupo como a linhagem de escolha para ter boas taxas de transfecção ou eletroporação e boa frequência de edição gênica.

Para avaliação da eficácia dos RNAg, as células HEK 293 foram eletroporadas nas seguintes condições: **1)** pX458 contendo RNAg 1; **2)** contendo RNAg 2; **3)** pX458 vazio, não recombinante (5 μ g) e **4)** apenas HEK 293 (Mock). Após a eletroporação, as células foram mantidas em cultura e no terceiro dia após a eletroporação (D+3) as células foram observadas por microscopia de fluorescência para a verificação de células positivas para GFP, figura 11, para então ser realizado a purificação dessas células fluorescentes (FACS) utilizando citômetro de fluxo.

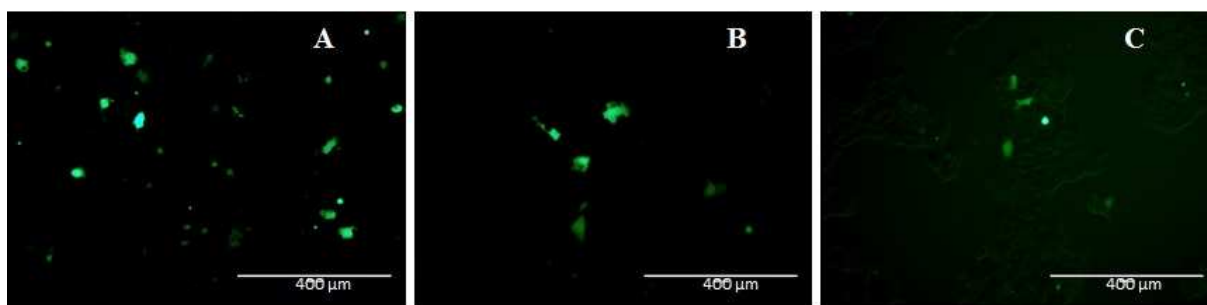


Figura 11. Análise por microscopia de fluorescência (EVOS) de células GFP⁺. No terceiro dia após transfecção foi observado por microscopia de fluorescência, em aumento 10X, células positivas para GFP transfectadas pelo plasmídeo recombinante contendo RNAg 1 (A), pelo

plasmídeo recombinante contendo RNAg 2 (B) e pelo plasmídeo vazio (controle), ou seja, sem RNAg (C).

Após a purificação das células GFP⁺, o DNA dessas células foi extraído e então realizado PCR para amplificação da região alvo da Cas9 guiada, gerando amplicons de 412 pb. Esses amplicons foram purificados e subclonados em plasmídeo linearizado pCR[®] 2.1 - TOPO[®] através da ligação de adenosina (A) projetada na extremidade 3' dos produtos de PCR, à timina (T) completar presente no sítio de clonagem desse plasmídeo, clonagem T-A.

Após a subclonagem, o plasmídeo pCR[®] 2.1 -TOPO[®] foi inserido em bactérias competentes E. coli TOP-10f (invitrogen Life Science), as quais foram cultivadas em placa contendo meio LB-ampicilina-ágar por 16 horas em estufa a 37°, e em seguida realizado PCR das colônias que apresentaram resistência ao antibiótico. Para o PCR, foram coletadas 20 colônias de cada RNAg e 15 colônias controle (HEK + pX458 vazio) e como resultado, foram obtidas 15/20 colônias contendo RNAg 1, 17/20 colônias contendo o RNAg 2 e 11/15 colônias controle apresentando peso molecular (gel de agarose 1%) compatíveis com o esperado, aproximadamente 600 pb, sendo 412 da região de análise de clivagem da Cas9 guiada complementados de aproximadamente 100 pb em cada extremidade amplificado pelo primer M13 (senso e reverso).

Para a confirmação da eficácia dos RNAg através de análise da presença de mutação indel ocasionada pela clivagem da Cas9 no DNA genômico de células HEK 293, foi realizado sequenciamento dos amplicons obtidos após PCR das colônias. Os resultados obtidos mostram que das 15 colônias cujas células foram transfectadas com RNAg 1, 93,3% apresentaram mutação indel; das 17 colônias cujas células foram transfectadas com RNAg 2, 11,7% apresentaram mutação indel, enquanto que as colônias controle não apresentaram mutação indel, gráfico 1.

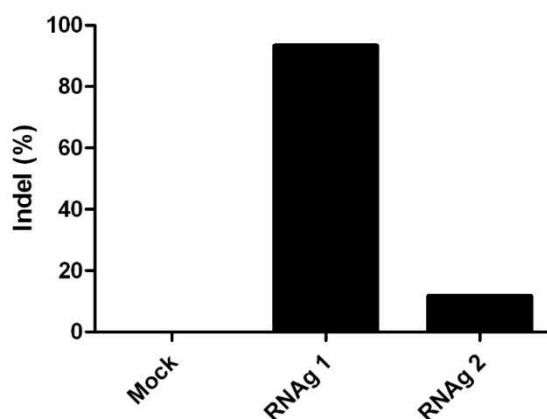
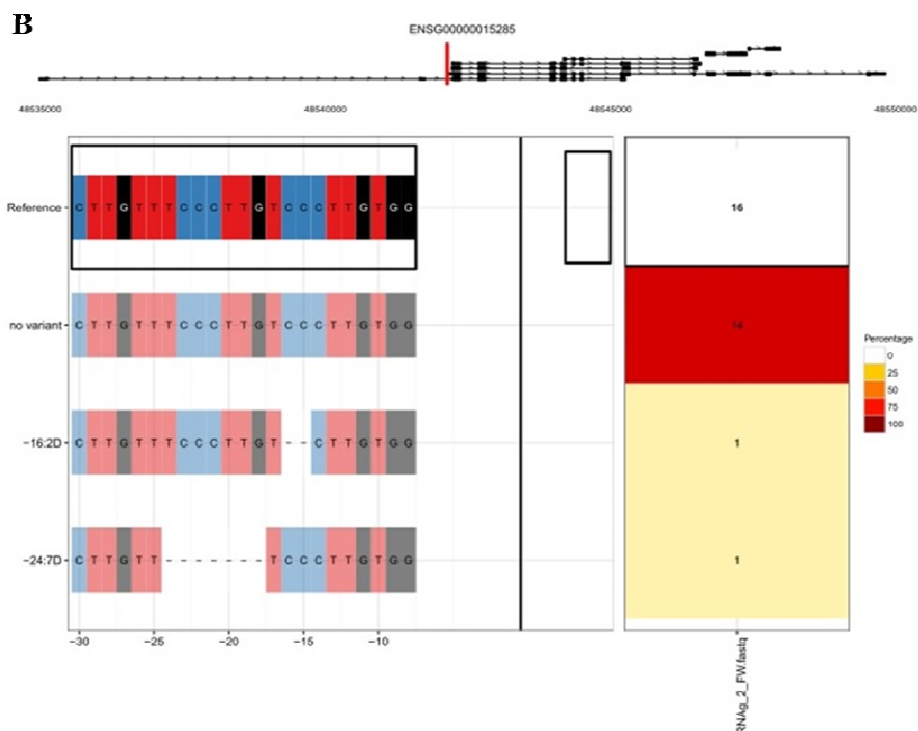
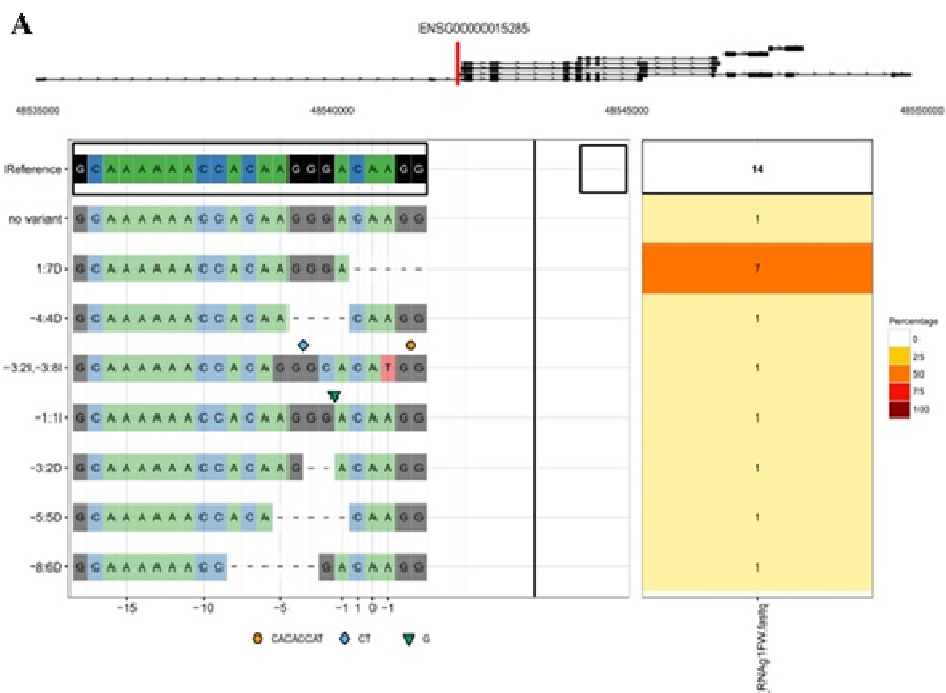


Gráfico 1. Frequência de mutação indel. Das colônias analisadas das células transfectadas com cada um dos RNAg, o RNAg 1 apresentou frequência de 93,3% de mutação indel, o RNAg 2 apenas 11,7% e as células eletroporadas na ausência de qualquer RNAg (Mock) apresentou 0% de mutação indel.

Da caracterização das mutações observadas no sítio alvo da Cas9 guiada, nossos resultados mostraram que do RNAg 1, 14/15 colônias apresentaram inserção e/ou deleção de nucleotídeos, dessas 14 colônias que apresentaram mutação em seu DNA, em 9 (64,3%) colônias a mutação ocorreu entre as 17^a e 18^a bases na sequência alvo; em 2 (14,3%) colônias a mutação ocorreu entre as 18^a e 19^a bases; 1 (7,1%) apresentou a mutação entre as 15^a e 16^a bases; 1 (7,1%) apresentou a mutação entre as 14^a e 15^a bases e 1 (7,1%) apresentou a mutação entre as 10^a e 11^a bases na sequência alvo. Na avaliação da eficácia do RNAg 2, nossos resultados mostraram mutações do tipo deleção em apenas 2 colônias das 17 analisadas, sendo dessas 2 colônias, 1 (50%) apresentou a mutação entre as 15^a e 16^a bases, 1 (50%) apresentou a mutação entre as 14^a e 15^a bases na sequência alvo. Das colônias controle, pX458 com RNAg ausente, não foram observadas nenhum tipo de mutação na sequência de DNA analisada, resultado sumarizado nos gráficos 2 A, B e C.



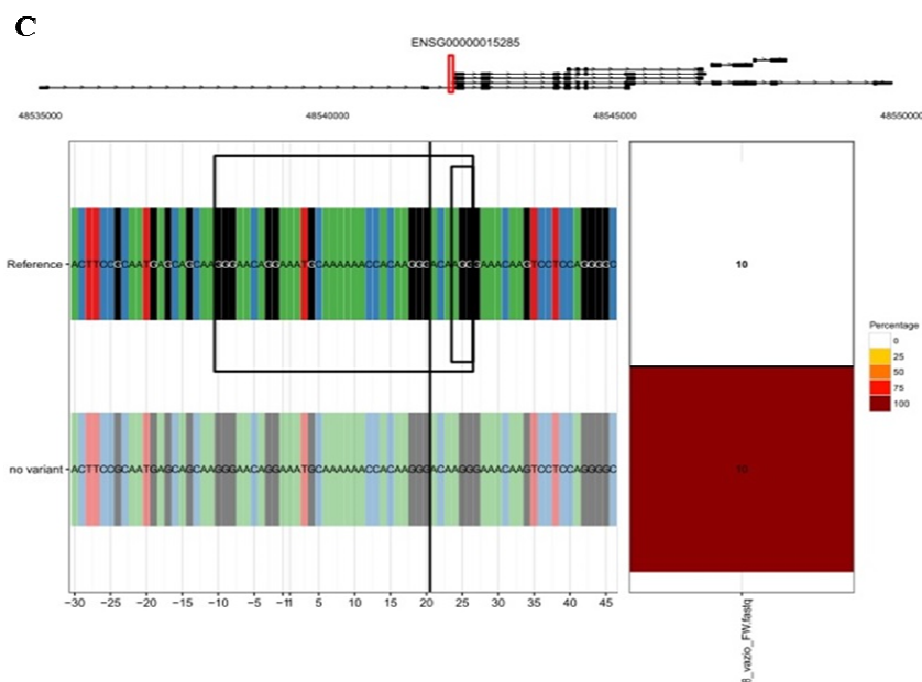


Gráfico 2. Alinhamentos para região alvo (CrisprVariantsLite). O DNA das colônias foram alinhados para a região alvo renumerando as variantes com respeito a um ponto zero, tipicamente o local de clivagem pela Cas9, três bases acima de PAM. (A) RNAg 1; (B) RNAg 2; (C) pX458 sem RNAg.

6.3 Transferência gênica de *GFP/WAS*

Para a quantificação de transferência gênica por recombinação homóloga, células de origem não hematopoética como a HEK 293 e de origem hematopoéticas como as PBMCs e Jurkat, foram editadas com o sistema CRISPR/Cas9, utilizando o RNAg 1 previamente validado, na presença da sequência doadora *GFP/WAS*.

A primeira etapa do ensaio de transferência gênica foi avaliar a integridade do plasmídeo pX459 recombinante, contendo sequência guia 1. Para tal, foi realizado digestão do DNA plasmidial com as seguintes enzimas de restrição: EcoRI que formam dois fragmentos com tamanhos de 669 pb e 8506 pb; EcoRV formando um fragmento de 9175 pb; NdeI formando dois fragmentos de 416 pb e 8759 pb; e EcoRI em conjunto com NdeI formando

quatro fragmentos de 669 pb, 416 pb, 4905 pb e 6010 pb. Análises por migração eletroforética em gel de agarose 0,8% mostraram bandas correspondentes aos tamanhos esperados, como observado na figura 12.

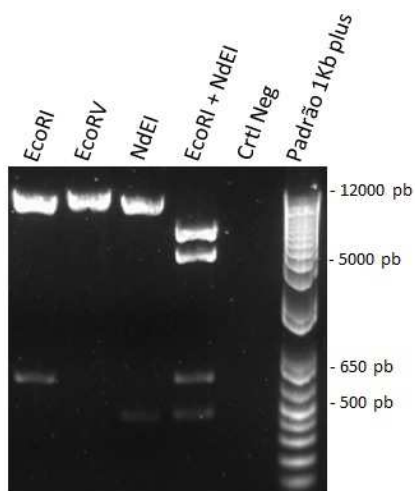


Figura 12. Digestão enzimática pX459 recombinante. Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando bandas correspondentes aos fragmentos de DNA do plasmídeo pX459 recombinantes contendo RNAg 1 digerido com enzimas de restrição.

Para avaliar a transferência gênica de *GFP/WAS*, foram realizados 3 ensaios em que as células HEK 293 foram eletroporadas nas seguintes condições: **1)** pX458 contendo RNAg 1; **2)** pX458 vazio (não recombinante) **3)** co-transfecção: pX458 contendo RNAg 1 + doador *GFP/WAS* e **4)** apenas células (Mock). No terceiro dia após a eletroporação (D+3), foi verificado, por citometria de fluxo, o percentual de células positivas para GFP, apresentando uma mediana de 12,8% (12,0-12,8%) células GFP⁺ eletroporadas com pX458 contendo RNAg 1; 17,8% (6,4-17,8%) de células GFP⁺ eletroporadas com pX458 vazio e 13,7% (12,0-13,7) de células GFP⁺ co-eletroporadas com pX458 contendo RNAg 1 + doador *GFP/WAS*, detalhado na tabela 3.

Ensaio	Mock	RNAg	pX458 vazio	RNAg + GFP/WAS
1	0,00%	12,00%	6,40%	13,70%
2	0,00%	18,90%	18,10%	30,60%
3	0,00%	12,80%	17,80%	12,00%
Mediana	0,00%	12,80%	17,80%	13,70%

Tabela 3. Análise por citometria de fluxo da expressão de GFP plasmidial, pX458, em células HEK 293. Após eletroporação, a expressão de GFP foi avaliada para confirmação da inserção do plasmídeo nas células HEK 293 submetidas à eletroporação.

As células GFP⁺ foram purificadas por FACS sendo uma porção mantida em cultura e do restante das células purificadas foi extraído o DNA para amplificação da região de edição pela Cas9 a fim de identificar a inserção da sequência doadora *GFP/WAS*, nesse caso, amplificando uma região de 1046 pb como ilustrado na figura 13.

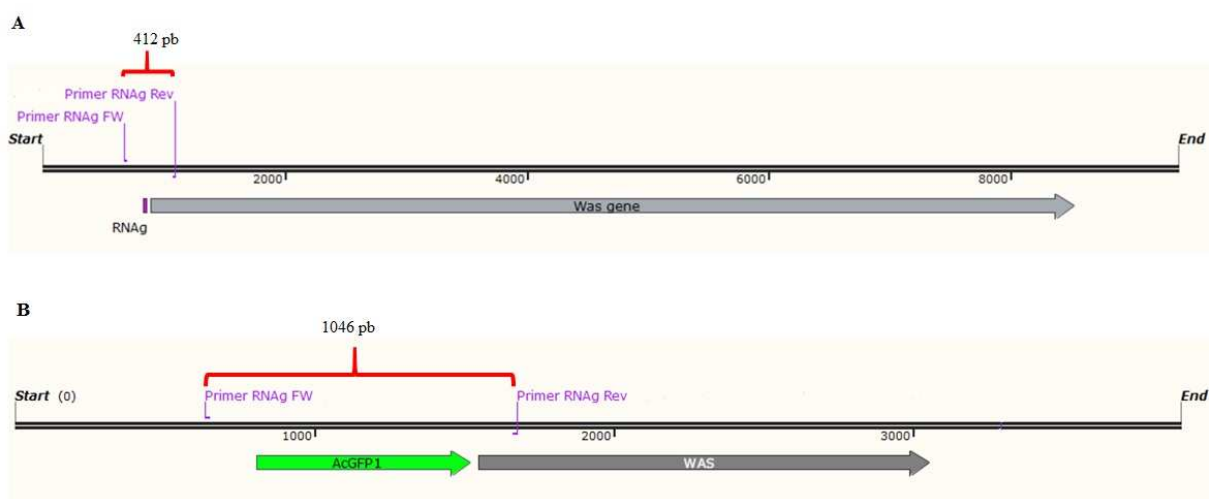


Figura 13. Análise de inserção de *GFP/WAS*. Na amplificação de células editadas após co-eletroporação de RNAg e *GFP/WAS*, a sequência de 412 pb indicará ausência de inserção de *GFP/WAS* (A), enquanto que a sequência de 1046 pb indicará inserção da sequência doadora *GFP/WAS* (B).

Após amplificação pela técnica de PCR do DNA das células HEK293 purificadas, foi possível observar por eletroforese em gel de agarose 0,8%, nos 3 ensaios realizados, tanto bandas correspondentes a 412 pb como de 1046 pb em amostras co-eletroporadas com RNAg e *GFP/WAS*, mostrado na figura 14.

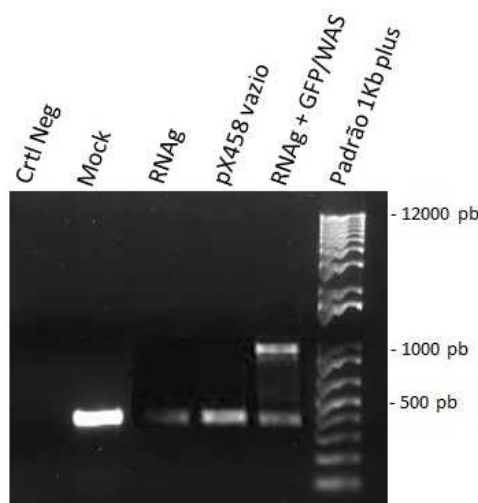


Figura 14. Amplificação da região de edição pela Cas9. Em análise de eletroforese em gel de agarose 0,8% observamos a banda de 412 pb em amostras editadas apenas com a cas9 ou não editadas, como o pX458 vazio, indicará ausência de inserção de *GFP/WAS* (A) e banda compatível com a sequência de 1046 pb indicando a amplificação da sequência doadora *GFP/WAS* (B).

A caracterização das sequências amplificadas foi realizada pela técnica de sequenciamento e, posterior comparação por alinhamento das sequências amplificadas com a sequência doadora *GFP/WAS* desenhada, utilizando a ferramenta ClustalIW. Na amostra eletroporada apenas com o RNAg, foi observada inserção de nucleotídeos entre as bases 17-18 do RNAg. Na amostra cuja RNAg foi co-eletroporado com a sequência doadora *GFP/WAS*, as bandas de 412 pb e 1046 pb foram analisadas separadamente assim, a banda de 412 pb apresentou um padrão de mutação semelhante àquela em que o RNAg foi utilizado sozinho. Já a banda de 1046 pb, a análise por alinhamento mostrou sequência correspondente

ao gene *GFP* que compõe a sequência doadora. Nas condições mock e pX458 vazio, as amostras analisadas não apresentaram alterações na sequência nucleotídica original.

Com o objetivo de confirmar se as sequências amplificadas correspondiam ao doador inserido no genoma da célula ou do plasmídeo, o DNA das células mantidas em cultura por 26 dias foi extraído para amplificar novamente a região de edição pela Cas9 a fim de verificar a persistência da amplificação da sequência de 1046 pb, o que indicaria a efetiva inserção de *GFP/WAS* no DNA genômico da célula. Em análise por eletroforese em gel de agarose 0,8%, foi observado ausência da banda correspondente aos 1046 pb, indicando que a sequência amplificada no D+3 após eletroporação correspondia à *GFP/WAS* inserida no plasmídeo e, como o DNA plasmidial tende a sofrer degradação, corrobora com o resultado obtido, figura 15.

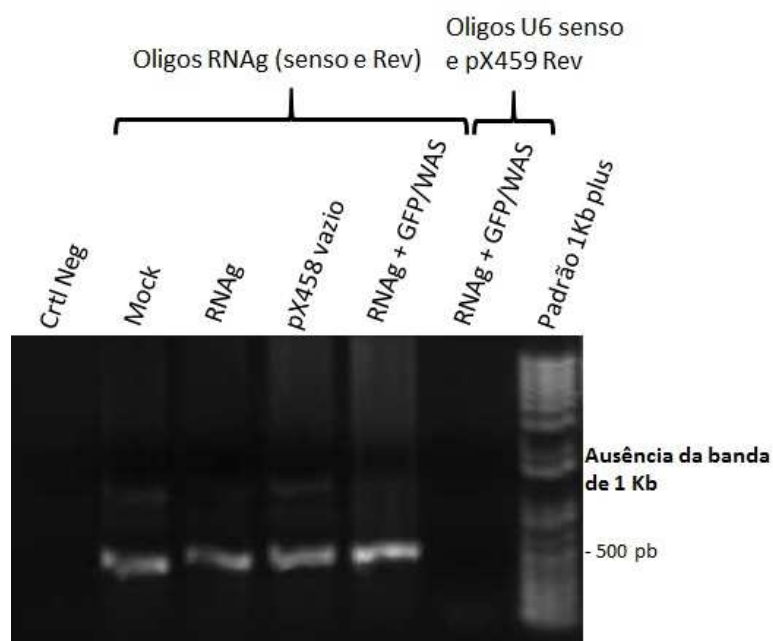


Figura 15. Amplificação da região de edição pela Cas9 após 26 dias de cultivo celular. Em análise de eletroforese em gel de agarose 0,8% observamos apenas a banda correspondente a 412 pb em amostras editadas com a Cas9 incluindo as co-transfectadas com *GFP/WAS*. Para confirmação da ausência de DNA plasmidial na amostra analisada, a análise mostra ausência de

banda na amostra aplicada com primers específicos para amplificação do plasmídeo utilizado para inserção da sequência doadora *GFP/WAS*, U6 senso e pX459 reverso.

A quantificação da eficiência de transferência gênica da sequência doadora *GFP/WAS* foi realizada por citometria de fluxo através da quantificação de expressão de GFP em células Jurkat e PBMC eletroporadas nas seguintes condições: **1)** pX459 contendo RNAg 1; **2)** pX459 vazio (não recombinante) **3)** co-transfecção: pX459 contendo RNAg 1 + doador *GFP/WAS* e **4)** apenas células (Mock). Após a eletroporação, as células foram mantidas em cultura com meios apropriados e 24 horas após a eletroporação, as PBMC foram tratadas com beads de ativação de linfócitos T humano CD3/CD28 na proporção de 1:1 e mantidas em cultura com meio acrescido de IL-2 para expansão de linfócitos T. A partir do D+3 pós eletroporação, passou a ser retirada uma alíquota de células para a verificação de células positivas para GFP, utilizando citômetro de fluxo. A verificação da expressão de GFP nas células Jurkat e PBMC, foi acompanhada durante 18 dias de cultivo. Os resultados, por citometria de fluxo, mostraram uma baixa eficiência na transferência gênica da sequência doadora *GFP/WAS*, onde foi observada uma expressão de GFP de 0,23% em PBMC e 0,11% em Jurkat após eletroporação, mostrado na tabela 4.

	Mock	RNAg	pX459 vazio	RNAg + GFP/WAS
Jurkat	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%
PBMC	0,00%	0,00%	0,00%	0,23%

Tabela 4. Análise por citometria de fluxo da expressão de GFP proveniente da sequência doadora, em células hematopoéticas Jurkat e PBMC. Em análise por citometria de fluxo foi observado 0,11% de células Jurkat expressando GFP e 0,23% de células PBMC expressando GFP, ambas após serem co-eletroporadas com RNAg e sequência doadora *GFP/WAS*.

Para a confirmação da inserção da sequência doadora no DNA genômico das células hematopoéticas foram realizadas ampliações de regiões únicas de inserção utilizando primers, senso e reverso, específicos para o reconhecimento do DNA genômico e sequência doadora. Assim, foram utilizados dois pares de primers, *GFP/WAS 1* e *GFP/WAS 2*, sendo o primeiro par composto por um primer senso homólogo ao DNA genômico e seu reverso homólogo à sequência doadora. Já no segundo par de primer, o senso possui homologia à região de união da extremidade 3' do cDNA *WAS* com a extremidade 5' do braço de homologia que compõem a sequência doadora e o primer reverso possui homologia ao DNA genômico, como ilustrado na figura 16.

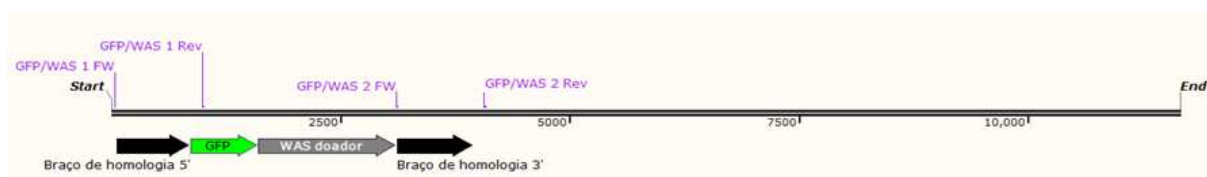


Figura 16. Inserção da sequência doadora *GFP/WAS* no DNA genômico de células hematopoéticas. Esquema representando edição do gene *WAS* com inserção da sequência doadora, mostrando dois pares de primers (*GFP/WAS 1* e *2*) que reconhecem regiões específicas de inserção e amplificam regiões de 982 pb.

Após os 18 dias de cultivo das células Jurkat e PBMCs, o DNA das células foi extraído para amplificação do DNA genômico, utilizando os primers *GFP/WAS 1* e *2* para confirmação da inserção da sequência doadora nas amostras co-eletroporadas com RNAg e sequência doadora *GFP/WAS*. Nossos resultados mostraram que tanto em células Jurkat como em PBMCs ocorreu amplificação da sequência correspondente ao par de primers 2 (*GFP/WAS 2*) e possível amplificação da sequência correspondente ao par de primer 1 (*GFP/WAS 1*) em PBMCs, indicando a inserção da sequência doadora no DNA genômico, figura 17.

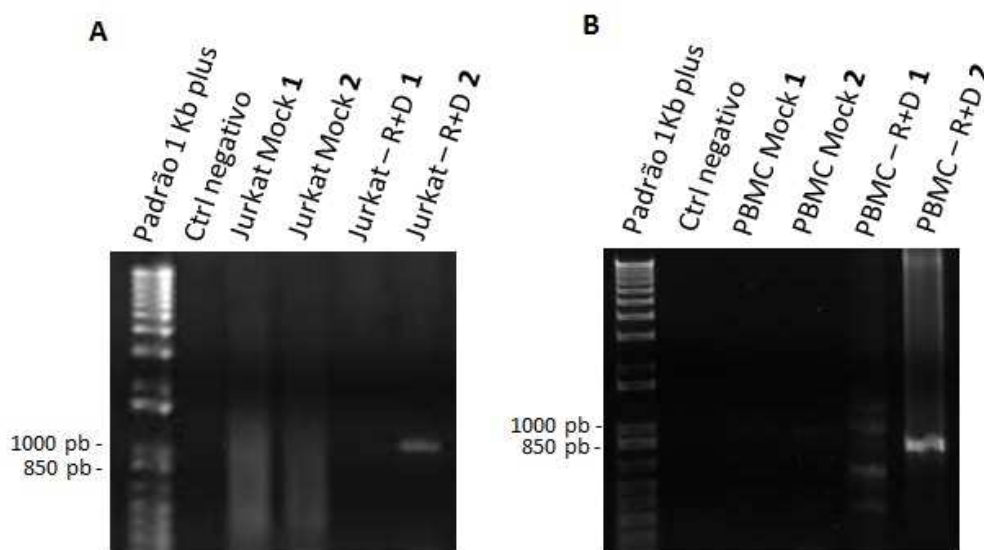


Figura 17. Amplificação da sequência de confirmação de inserção de *GFP/WAS* no DNA genômico de células hematopoéticas. Em análise de eletroforese em gel de agarose 0,8% observamos, tanto em células Jurkat (A) como em PBMCs (B), a banda correspondente aos 982 pb para os primers *GFP/WAS* 2 além de uma possível amplificação em PBMC para os primers *GFP/WAS* 1 nas amostras co-eletroporadas com RNAg e *GFP/WAS*.

6.4 Validação do método de transfecção de CTPH CD34⁺ e ensaio funcional

Para a validação do processo de eletroporação em CTPH CD34⁺ obtidas de SCUP, o gene repórter GFP foi introduzido nas células seguindo o método de eletroporação descrito em um cassete de expressão gênica integrativo baseado no sistema transposons-transposase como descrito por Chicaybam e colaboradores (114). As células foram então quantificadas e funcionalmente avaliadas com ensaios de formação de colônias e a expressão de GFP por citometria de fluxo.

Após a purificação das células CD34⁺ de SCUP, no ensaio de CFU, as células foram cultivadas por 3 semanas em meio metilcelulose específico para esse tipo de célula, em

seguida as colônias foram identificadas e quantificadas, através do equipamento StemVision[®] (StemCell Technologies), afim de avaliar se as células após sofrerem eletroporação, continuavam capazes de formar colônias. Foram realizados 3 ensaios de CFU, em duplicata, sendo um ensaio com células não-eletroporadas (*amostra 1*) e outros dois ensaios com células eletroporadas, utilizando uma concentração celular de 5×10^2 células CD34⁺ purificadas (*amostra 2*), e uma concentração de 2×10^3 células CD34⁺ purificadas (*amostra 3*), mostrado na tabela 4. As análises mostraram que ao comparar as células que sofreram processo de eletroporação para inserção da sequência doadora com as células não-eletroporadas, 23% das células da *amostra 2* foram capazes de formar colônias, enquanto que na *amostra 3*, 18% das células formaram colônias.

	CNT (10^8)	CMN (10^8)	CD34+ (10^2)	CFU (10^5)
Fresco	11,7	11,4	–	–
Pós-ficoll				
<i>Amostra 1</i>	–	0,7	5	84
<i>Amostra 2</i>	–	0,7	5	19,6
<i>Amostra 3</i>	–	0,7	20	15

Tabela 5. Dados de celularidade das amostras. A tabela mostra tanto o número de células nucleadas totais (CNT) como o número de células mononucleadas (CMN) da amostra a fresco. A amostra foi submetida à separação de CMN por gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque[®] 1077) e a partir dessa população de células, as células CD34⁺ foram purificadas, sendo uma porção não-eletroporada (*amostra 1*) e outra porção eletroporada para inserção do gene repórter GFP (*amostras 2 e 3*), então cultivadas para ensaio de CFU em diferentes concentrações celulares.

Por meio da microscopia de fluorescência, foi possível avaliar a expressão do gene repórter GFP incorporado no genoma das células que compunham colônias formadas no ensaio de CFU, figura 18.

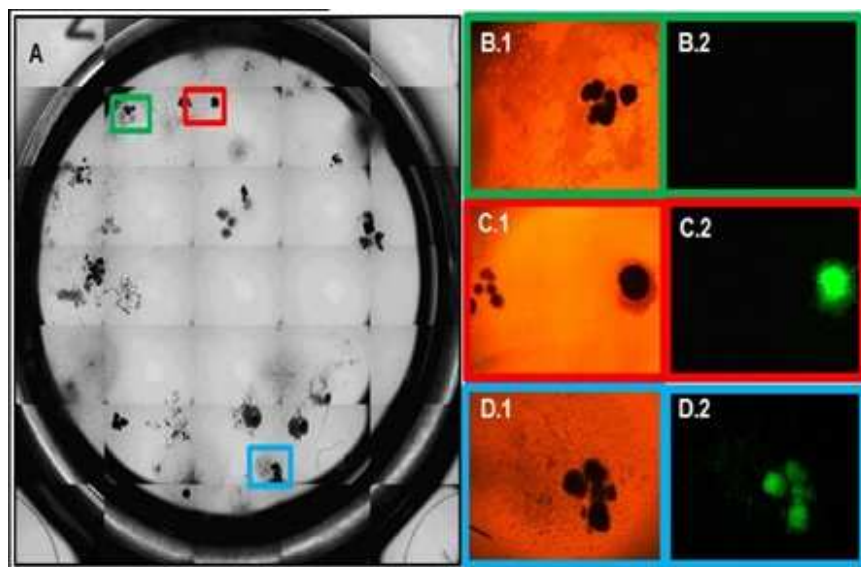


Figura 18. Quantificação e identificação de colônias. As colônias foram identificadas e quantificadas pelo equipamento StemVision[®] (A) e análise da expressão do gene repórter GFP, por microscopia de fluorescência (B, C e D). A imagem B1 mostra uma colônia da linhagem eritróide (BFU-E, burst-forming unit-erythroid) negativa para a expressão de GFP, como indicado na respectiva imagem de fluorescência B2 (em verde). A imagem C1 mostra uma colônia BFU-E que apresentou expressão de GFP, mostrado na imagem C2(em vermelho). E a imagem D1, mostra uma colônia mista, composta de células da linhagem eritróide, granulócítica, monocítica e megacariocítica (CFU-GEMM, colony-forming unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte), expressando GFP (em azul).

Em 3 semanas de cultura, do total de colônias analisadas pela microscopia de fluorescência (N=39), observamos que 38,5% expressaram o gene repórter GFP. Na citometria de fluxo foi verificado o percentual de expressão do gene repórter GFP nas células pós-cultivo, ou seja, considerando um total de células mais diferenciadas. Assim, foi observado que na *amostra 2*, 19,4% do total de células nucleadas expressaram o gene repórter GFP enquanto que na *amostra 3*, houve expressão em 15,6% do total das células analisadas, mostrado na figura 19.

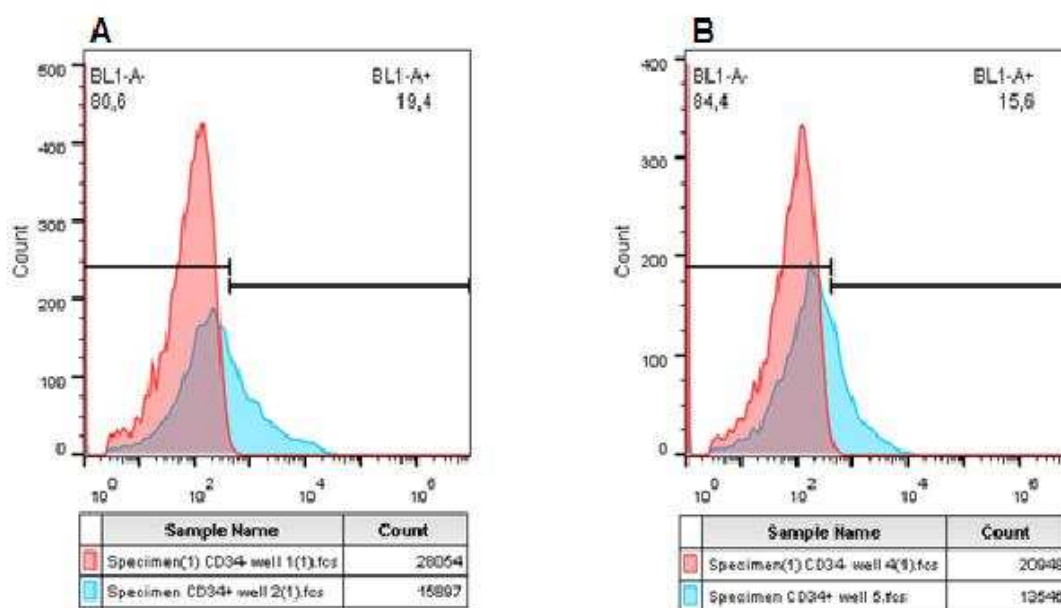


Figura 19. Quantificação de GFP, por Citometria de fluxo, em células CD34+. Análise por citometria de fluxo de células nucleadas totais, pós-cultivo. Os histogramas mostram o percentual de células positivas para GFP. As células que não sofreram eletroporação (em vermelho), indicando o limite de negatividade para GFP e as que sofreram eletroporação (em azul) apresentam aumento na positividade para GFP. Na imagem A os dados obtidos pelo software FlowJo mostra o número de células presentes na aquisição da amostra de células não eletroporadas (28054 eventos) que foi superior ao número de células eletroporadas (15897 eventos), e indica a positividade de GFP em 19,4% das células eletroporadas. Da mesma forma, a imagem B mostra um segundo poço analisado com número de células não eletroporadas com número também superior (20948 eventos) aos da amostra eletroporada (13546 eventos), associado a uma expressão de GFP em 15,6% das células eletroporadas frente as não eletroporadas.

7. DISCUSSÃO

Uma das principais características da edição genômica precisa baseada em métodos não-virais para a transferência de gene, como o sistema CRISPR/Cas9, é que os promotores endógenos, elementos regulatórios e acentuadores podem ser preservados para a expressão do gene (115,116). A WAS é causada por mutações no gene *WAS*, que comprometem a função ou a síntese de WASP (3). O gene *WAS* possui dois promotores, o proximal, localizado 3 kb acima do sítio de início da região de codificação e o distal, localizado 6 kb acima, ambos com atividade hematopoética (46–48). Além disso, possuem elementos regulatórios capazes de influenciar a expressão do gene *WAS* localizados à 40 kb e 250 kb da extremidade 5' do gene (116). Dessa forma, o local escolhido para inserção da sequência doadora *GFP/WAS* desenhada tem potencial para garantir a preservação dos promotores endógenos.

A especificidade da endonuclease Cas9 é determinada pela sequência guia desenhada composta de 20 nucleotídeos, os quais compõem o RNAg, sendo a única exigência para a seleção do sítio alvo da Cas9 a presença de uma sequência PAM precedendo a sequência guia, que para a spCas9, utilizada no presente trabalho, é requerido uma sequência PAM 5'-NGG (29).

Vários fatores podem influenciar a edição gênica mediada HDR utilizando o sistema CRISPR/Cas como o desenho da sequência que compõe o RNAg e da sequência de DNA doadora, além de sua configuração no que diz respeito ao tamanho de braço de homologia, disponibilidade de sítios de reconhecimento da sequência PAM próximo ao sítio de edição, entrega, assim como as condições de entrega de RNAg e endonuclease Cas9 (117). Nossos resultados mostraram uma variabilidade na eficiência da clivagem da fita dupla de DNA entre os RNAg desenhados, pois apesar das duas sequências guias desenhadas disponibilizarem locais PAM na proximidade da edição pretendida, 20-30 pb do início do exon 1, apenas uma

das sequências guias, RNAg 1, apresentou alta eficiência na localização de um potencial ponto de clivagem da fita dupla de DNA genômico. Dessa forma, considerando que ambos RNAg desenhados, tenham sido submetidos as mesmas condições de entrega e Cas9 de mesma origem, a predição de clivagem deve ser considerada, pois Tycho e colaboradores, em 2016, revisaram métodos para otimizar a especificidade da edição genômica utilizando o sistema CRISPR/Cas9 e concluíram que apesar dos avanços nas estratégias de otimização, a acurácia de uma predição *in silico* pode variar (111).

A literatura mostra que o padrão de clivagem de SpCas9 é conhecido por realizar corte do tipo cego na fita dupla de DNA em torno das 17^a e 18^a bases na sequência alvo, que corresponde à aproximadamente o 3^o pb 5' da sequência PAM (29,118,119). Nossos resultados mostraram que o RNAg 1 foi eficaz na clivagem sítio-dirigida, apresentando 93,3% de células com mutação indel no sítio alvo do gene *WAS*, onde 14/15 colônias apresentaram inserção e/ou deleção de nucleotídeos e, dessas colônias que apresentaram mutação em seu DNA, todas apresentaram clivagem próximo à sequência PAM, 3^o-5^o pb 5'. Portanto, o padrão de clivagem do RNAg 1 mostrou ser semelhante ao relatado na literatura.

Apesar de ter sido demonstrada a eficácia do RNAg1 em clivar a fita dupla de DNA, não foi possível observar HDR eficiente ao ser co-transfectado com uma sequência doadora. O mecanismo de reparo de quebra de DNA genômico por HDR é preciso, no entanto a eficiência é considerada muito baixa, ocorrendo numa taxa de 0,5-5,0% (120–122). Em geral, dados da literatura têm mostrado que os tamanhos da sequência de inserção corrigida e dos braços de homologia são os maiores determinantes na eficiência de HDR. Há estudos mostrando que o tamanho da sequência de correção gênica entre os braços de homologia, varia entre 1-2,5 kb, diminuindo a eficiência da recombinação à medida que o tamanho da sequência de correção aumenta (123–125). No presente estudo, o tamanho da sequência de inserção entre os braços de homologia, considerando o gene repórter GFP flanqueado a

sequência de correção para o gene *WAS*, possui um tamanho de 2,25 kb, estando em conformidade com os comprimentos de fragmentos que apresentam melhor eficiência de reparo por HDR.

Em relação ao tamanho dos braços de homologia, diferentes estudos, têm avaliado o tamanho ideal dos braços de homologia de maneira a atingir maior eficiência na correção gênica mediada HDR após clivagem da fita dupla de DNA genômico. Em geral, estudos mostram que o tamanho das sequências de homologia devem ter no mínimo 0,5 kb de comprimento (126–128).

Hasty e colaboradores, em 1991, avaliaram a taxa de reparo por HDR em células tronco embrionária comparando a frequência de genes alvos com diferentes tamanhos de braços de homologia, que variaram entre 1,3 kb e 6,8 kb (128). Os autores utilizaram plasmídeos circulares para entrega da sequência alvo, utilizando eletroporação como método de transfecção, e mostraram que a frequência de células editadas aumenta com o aumento do comprimento dos braços de homologia.

Em 2015, Beaton e colaboradores, também utilizaram diferentes comprimentos de braços de homologia, variando entre 60 pb e 1779 pb, para avaliar o efeito do tamanho do braço de homologia de DNA doador, na correção dos genes *GGTA1* após clivagem da fita dupla de DNA genômico (126). Através de análise por FACS de células fibroblásticas, os autores observaram uma frequência maior de correção bi-alélica em células editadas com sequências doadores contendo braços de homologia maiores.

Já em 2017, Zhang e colaboradores, avaliaram o uso convencional de plasmídeo circular para entrega da sequência doadora e RNAg/Cas9 na eficiência de HDR e o menor tamanho requerido de braço de homologia para altos níveis de edição genômica (127). Os autores concluíram que, considerando o uso de plasmídeo circular para entrega da sequência doadora e RNAg/Cas9, para atingir altos níveis de inserção precisa de uma sequência grande

de DNA doador (aproximadamente 2 kb), após clivagem da fita dupla de DNA, em células de origem humana, é necessário um braço de homologia de no mínimo 600 pb, apresentando um aumento na eficiência de inserção de DNA doador mediado por HDR de 97-100% após tratamento das células com reguladores de ciclo celular para estimular HDR, que ocorre preferencialmente durante a fase S/G2 do ciclo celular.

A estratégia de entrega de RNAg/Cas9 utilizada no estudo, foi através de DNA plasmidial, pois podem persistir em altos níveis na células durante vários dias, após transfecção, se comparado a outras formas de entrega, como o complexo ribonucleico, por exemplo, o qual possui meia-vida curta na célula (129). O método utilizado de transfecção desse DNA plasmidial recombinante contendo RNAg com a Cas9 incorporada foi eletroporação, que é um método não-viral altamente eficaz na expressão de transgene em diferentes linhagens e tipos celulares, incluindo as de origem humana (114,130–132). Além disso, parâmetros de eletroporação também são incluídos como fatores críticos na eficácia da entrega de transgene em uma grande variedade de células e, considerando esses fatores, as condições de eletroporação utilizadas no estudo foram baseadas em métodos previamente validados, sendo capaz de induzir alta expressão de transgene e moderada toxicidade celular (114,133).

Na terapia gênica, as CTPH são consideradas alvos atrativos devido ao potencial que essas células possuem para auto-renovação e diferenciação em diferentes linhagens, propriedades importantes na transferência de genes que poderiam resultar no tratamento de diversas doenças, incluindo as IDP (134–136). Além disso, estudos recentes têm suportado a ideia de que as CTPH são mais resistentes à edição gênica mediada por HDR, mostrando edição dessas células numa frequência razoável (116,136). Genovese e colaboradores, em 2014, mostraram o potencial terapêutico na correção do gene *IL2RG* de CTPH de doadores saudáveis e de um indivíduo com imunodeficiência combinada severa ligada ao X (SCID-

X1), onde as CTPH editadas foram capazes de sustentar uma hematopoese normal originando células linfoides normais, as quais, apresentaram uma vantagem de crescimento seletivo sobre as células portadoras de mutações no gene *IL2RG* (136). Além disso, os autores mostraram que após tratamento das CTPH com moléculas estimuladoras de ciclagem celular, houve um aumento considerável na taxa de HDR em células primitivas.

Em 2016, Dever e colaboradores avaliaram a eficiência de HDR para a correção do gene β -globulina (*HBB*) em CTPH CD34⁺ derivadas de sangue periférico mobilizado, utilizando Cas9 associada ao complexo ribonucleico combinado com vetor viral adeno associado de sorotipo 6 (rAAV6) para a entrega do doador e, sendo demonstrado correção eficiente em CTPH derivadas de pacientes SCD, além de demonstrarem um novo método de purificação de celular através de FACS ou enriquecimento por beads magnéticas, em mais de 85% de células CTPH modificadas geneticamente por HDR (116).

O presente trabalho apresentou uma sequência de inserção *GFP/WAS* de 2,25 kb flanqueada à dois braços simétricos de homologia contendo um total de 1627 pb, 800 pb à esquerda e 827 pb à direita da sequência de inserção. Nossos resultados mostraram que apesar da baixa frequência de recombinação homóloga após clivagem do DNA genômico, o sistema CRISPR/Cas9 é eficaz na edição genômica do gene *WAS*, sugerindo que o desenho da sequência doadora, considerando o tamanho do braço de homologia assim como sua simetria, está adequada para correção do gene da síndrome de Wiskott-Aldrich. Dessa maneira, será possível provar o conceito da nova estratégia, sítio-dirigida, com finalidade terapêutica, através da edição do gene *WAS* em CTPH de paciente *WAS*.

8. CONCLUSÃO

- 1) O Sistema CRISPR/Cas9 é eficaz em clivar a sequência alvo de maneira dirigida no gene WAS;
- 2) Sugerimos que o desenho da sequência doadora é adequado para a correção endógena do gene WAS;

9. PERSPECTIVA

- 1) Utilização de moléculas estimuladoras para aumentar HDR.

10. REFERÊNCIAS*

1. Hernandez-Trujillo V. New genetic discoveries and primary immune deficiencies. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2014;46(2):145–53.
2. Marangoni F, Bosticardo M, Charrier S, Draghici E, Locci M, Scaramuzza S, et al. Evidence for long-term efficacy and safety of gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome in preclinical models. *Mol Ther.* 2009;17(6):1073–82.
3. Derry JM, Ochs HD FU. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell.* 1994;2(79):following 922.
4. Dupré L, Marangoni F, Scaramuzza S, Trifari S, Hernández RJ, Aiuti A, et al. Efficacy of Gene Therapy for Wiskott-Aldrich Syndrome Using a WAS Promoter / cDNA-Containing Lentiviral Vector and Nonlethal Irradiation. 2006;313(March):303–13.
5. Kim a S, Kakalis LT, Abdul-Manan N, Liu G a, Rosen MK. Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* 2000;404(6774):151–8.
6. Gismondi A, Cifaldi L, Mazza C, Giliani S, Parolini S, Morrone S, et al. Impaired natural and CD16-mediated NK cell cytotoxicity in patients with WAS and XLT: ability of IL-2 to correct NK cell functional defect. *Blood* 2004;104(2):436–43.
7. Snapper SB, Meelu P, Nguyen D, Stockton BM, Bozza P, Alt FW, et al. WASP deficiency leads to global defects of directed leukocyte migration in vitro and in vivo Abstract□: Intact cellular migration is critically im- portant for the induction and regulation of the im- tein (WASP) regulates surface receptor signaling to p. 2005;77(June):993–8.
8. Westerberg L, Larsson M, Hardy SJ, Fernández C, Thrasher AJ, Severinson E. Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency leads to reduced B-cell adhesion, migration, and homing, and a delayed humoral immune response. *Blood.* 2005;105(3):1144–52.
9. Massaad MJ, Ramesh N, Geha RS. Wiskott-Aldrich syndrome: a comprehensive review. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1285:26–43.
10. Ozsahin H, Cavazzana-Calvo M, Notarangelo LD, Schulz A, Thrasher AJ, Mazzolari E, et al. Long-term outcome following hematopoietic stem-cell transplantation in Wiskott-Aldrich syndrome: collaborative study of the European Society for Immunodeficiencies and European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood.* 2008;111(1):439–45.
11. Moratto D, Giliani S, Bonfim C, Mazzolari E, Fischer A, Ochs HD, et al. Long-term outcome and lineage-specific chimerism in 194 patients with Wiskott-Aldrich syndrome treated by hematopoietic cell transplantation in the period 1980-2009: an

* As referências seguem as normas propostas pelo Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Aplicada à Saúde da Criança e da Mulher do IFF.

- international collaborative study. *Blood*. 2011;118(6):1675–84.
12. Szilvassy SJ. *The Biology of Hematopoietic Stem Cells*. 2004;34(2003):446–60.
 13. Mulloy JC, Cammenga J, Berguido FJ, Wu K, Zhou P, Comenzo RL, et al. Maintaining the self-renewal and differentiation potential of human CD34⁺ hematopoietic cells using a single genetic element. 2014;102(13):4369–77.
 14. Alvarado-moreno JA, Flores-guzma P. *Biology of Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Present in Circulation*. 2004;34(2003):476–88.
 15. Filipovich a. H. Impact of donor type on outcome of bone marrow transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome: collaborative study of the International Bone Marrow Transplant Registry and the National Marrow Donor Program. *Blood*. 2001;97(6):1598–603.
 16. Dupré L, Trifari S, Follenzi A, Marangoni F, Lain de Lera T, Bernad A, et al. Lentiviral vector-mediated gene transfer in T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients leads to functional correction. *Mol Ther*. 2004;10(5):903–15.
 17. Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, Ferrua F, Cicalese MP, Baricordi C, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science*. 2013;341(6148):1233151.
 18. Boztug K, Schmidt M SA, Banerjee PP, Ph D, Díez IA, Dewey RA, Böhm M, et al. Stem-Cell gene Therapy for the Wiskott-Aldrich Syndrome. *N Engl J Med*. 2010;
 19. Charrier S, Dupré L, Scaramuzza S, Jeanson-Leh L, Blundell MP, Danos O, et al. Lentiviral vectors targeting WASp expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients. *Gene Ther*. 2007;14(5):415–28.
 20. Braun CJ, Boztug K, Paruzynski A, Witzel M, Schwarzer A, Rothe M, et al. Gene Therapy for Wiskott-Aldrich Syndrome — Long-Term Efficacy and Genotoxicity. 2014;6(227):1–15.
 21. Scaramuzza S, Biasco L, Ripamonti A, Castiello MC, Loperfido M, Draghici E, et al. Preclinical safety and efficacy of human CD34(+) cells transduced with lentiviral vector for the treatment of Wiskott-Aldrich syndrome. *Mol Ther*. 2013;21(1):175–84.
 22. Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim J-S. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*. 2013;31(3):230–2.
 23. Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*. 2014;156(4):836–43.
 24. Furthermore A, Rna C. correspondence Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. 2013;31(8):681–3.
 25. Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas mediated genome engineering. 2014;154(6):1370–9.

26. Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*. 2010;327(5962):167–70.
27. Sorek R, Lawrence CM, Wiedenheft B. CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annu Rev Biochem*. janeiro de 2013;82:237–66.
28. Yoshimi K, Kaneko T, Voigt B, Mashimo T. Allele-specific genome editing and correction of disease-associated phenotypes in rats using the CRISPR-Cas platform. *Nat Commun*. 2014;5(May):4240.
29. Ran FA, Hsu PDP, Wright J, Agarwala V, Scott D a, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 2013;8(11):2281–308.
30. Fisher A, Hacein-Bey-Abina S C-CM. Gene therapy of primary T cell immunodeficiencies. *Gene*. 2013;525(2):170–3.
31. Imai K, Nonoyama S OH. WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) gene mutations and phenotype. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2003;3(6):427–36.
32. Ochs HD, Thrasher AJ. The Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(4):725–38.
33. Mercola KE, Stang HD, Browne J, Salser W, Cline MJ. Insertion of a new gene of viral origin into bone marrow cells of mice. *Science*. 1980;208(4447):1033–5.
34. Candotti F. Advances of gene therapy for primary immunodeficiencies. *F1000Research*. 2016;5(0):310.
35. Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 SUPPL. 2):S182–94.
36. BRASIL. Ministério da Saúde. Institui a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras, aprova as Diretrizes para Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) e institui incentivos financeiros de cust. PORTARIA No 199, 30 JANEIRO 2014. 2014;
37. Modell V, Quinn J, Orange J, Notarangelo LD, Modell F. Primary immunodeficiencies worldwide: an updated overview from the Jeffrey Modell Centers Global Network. *Immunol Res*. 2016;64(3):736–53.
38. Bousfiha AA, Jeddane L, Ailal F, Benhsaien I, Mahlaoui N, Casanova JL, et al. Primary immunodeficiency diseases worldwide: More common than generally thought. *J Clin Immunol*. 2013;33(1):1–7.
39. Carneiro-Sampaio M, Moraes-Vasconcelos D, Kokron CM, Jacob CMA, Toledo-Barros M, Dorna MB, et al. Primary immunodeficiency diseases in different age groups: A report on 1,008 cases from a single Brazilian reference center. *J Clin Immunol*. 2013;33(4):716–24.
40. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, et al. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency

2015. *J Clin Immunol.* 2015;35(8):696–726.
41. Brazilian Group for Immunodeficiency. <http://www.imunopediatria.org.br/>
 42. Wiskott A. Familiärer, angeborener Morbus Werholfi? *Mtschr Kinderheilk.* 1937;
 43. Aldrich R.A., Teinberg A.G. & Campbell DC Pedigree demonstrating a sex-linked condition characterized by draining ears, eczematoid dermatitis and bloody diarrhea. *Pediatrics.* 1954;13(133).
 44. Derry JM, Ochs HD, Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell.* 1994;78(4):635–44.
 45. Sullivan KE, Mullen CA, Blaese RM WJ. A multiinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Pediatr.* 1994;125(6 Pt 1):876–85.
 46. Parolini Oe of W-A syndrome protein (WASP) gene during hematopoietic differentiation., Berardelli S, Riedl E, Bello-Fernandez C, Strobl H, Majdic O, et al. Expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) gene during hematopoietic differentiation. *Blood.* 1997;90(1):70–5.
 47. Cavalli G, Misteli T. Functional implications of genome topology. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20(3):290–9.
 48. Zhan J, Johnson IM, Wielgosz M, Nienhuis AW. The identification of hematopoietic-specific regulatory elements for WASp gene expression. *Mol Ther.* 2016;3(October):1–10.
 49. Hui Wu, Cheng Hu, Dan Dang Y-JG. A Novel WASP Gene Mutation in a Chinese Boy with Wiskott–Aldrich Syndrome Indian. *J Hematol Blood Transfus.* 2014;30 (suppl :S353–5.
 50. Remold-O'Donnell E, Rosen FS KD. Defects in Wiskott–Aldrich syndrome blood cells. *Blood.* 1996;87(7):2621–31.
 51. Snapper SB RF. The Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP): roles in signaling and cytoskeletal organization. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:905–29.
 52. Imai K, Morio T, Zhu Y et al. Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood.* 2004;103(2):456–64.
 53. Worth AJ, Thrasher AJ. Current and emerging treatment options for Wiskott-Aldrich syndrome. *Expert Rev Clin Immunol.* 2015;11(9):1015–32.
 54. Buchbinder D, Nadeau K, Nugent D. Monozygotic twin pair showing discordant phenotype for X-linked thrombocytopenia and Wiskott-Aldrich syndrome: A role for epigenetics? *J Clin Immunol.* 2011;31(5):773–7.
 55. Orange JS, Ramesh N, Remold-O'Donnell E, Sasahara Y, Koopman L, Byrne M, Bonilla FA, Rosen FS, Geha RS, Strominger JL. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK-cell activating immunological synapses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(7):11351–6.

56. Recher M1, Burns SO, de la Fuente MA, Volpi S, Dahlberg C, Walter JE, et al. B cell-intrinsic deficiency of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) causes severe abnormalities of the peripheral B-cell compartment in mice. *Blood*. 2012;119(12):2819–28.
57. Al. H-BSSBAS et. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for regulatory T cell hemostasis. *J Clin Invest*. 2007;117(2):407–41.
58. Maillard MH, Cotta-de-Almeida V, Takeshima F, Nguyen DD, Michetti P, Nagler C, et al. The Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for the function of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *J Exp Med*. 2007;204(2):381–91.
59. Notarangelo LD. In Wiskott-Aldrich syndrome, platelet count matters. *Blood*. 2013;121(9):1484–5.
60. Shcherbina A, Cooley J, Lutskiy MI, Benarafa C, Gilbert GE R-O. WASP plays a novel role in regulating platelet responses dependent on alphaIIb beta3 integrin outside-in signaling. *Br J Haematol*. 2010;148(3):416–27.
61. Lutskiy MI, Shcherbina A, Bachli ET, Cooley J R-O. WASP localizes to the membrane skeleton of platelets. *Br J Haematol*. 2007;139(1):98–105.
62. Rodnick-Smith M, Luan Q, Liu S-L, Nolen BJ. Role and structural mechanism of WASP-triggered conformational changes in branched actin filament nucleation by Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113(27):E3834–43.
63. García E, Jones GE, Machesky LM, Antón IM. WIP: WASP-interacting proteins at invadopodia and podosomes. *Eur J Cell Biol*. 2012;91(11-12):869–77.
64. Hoshino D, Branch KM, Weaver AM. Signaling inputs to invadopodia and podosomes. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 14):2979–89.
65. Blundell MP, Worth A, Bouma G, Thrasher AJ. The Wiskott-Aldrich syndrome: The actin cytoskeleton and immune cell function. *Dis Markers*. 2010;29(3-4):157–75.
66. Goley ED, Welch MD. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(10):713–26.
67. Reicher B, Joseph N, David A, Pauker MH, Perl O, Barda-Saad M. Ubiquitylation-dependent negative regulation of WASp is essential for actin cytoskeleton dynamics. *Mol Cell Biol*. 2012;32(15):3153–63.
68. Majstoravich S, Zhang J, Nicholson-Dykstra S, Linder S, Friedrich W, Siminovitch KA, et al. Lymphocyte microvilli are dynamic, actin-dependent structures that do not require Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) for their morphology. *Blood*. 2004;104(5):1396–403.
69. Calvez R, Lafouresse F, de Meester J, Galy A, Valitutti S, Dupr?? L. The wiskott-aldrich syndrome protein permits assembly of a focused immunological synapse enabling sustained T-cell receptor signaling. *Haematologica*. 2011;96(10):1415–23.
70. Taylor MD, Sadhukhan S, Kottangada P, Ramgopal A, Sarkar K, Silva SD, et al.

- Nuclear Role of WASp in the Pathogenesis of Dysregulated TH1 Immunity in Human Wiskott-Aldrich Syndrome. 2011;2(37):37ra44.
71. Sadhukhan S, Sarkar K, Taylor M, Candotti F, Vyas YM. Nuclear role of WASp in gene transcription is uncoupled from its ARP2/3-dependent cytoplasmic role in actin polymerization. *J Immunol.* 2014;193(1):150–60.
 72. Marangoni F, Trifari S, Scaramuzza S, Panaroni C, Martino S, Notarangelo LD, et al. WASP regulates suppressor activity of human and murine CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) natural regulatory T cells. *J Exp Med.* 2007;204(2):369–80.
 73. Lanier L. Evolutionary struggles between NK cells and viruses. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:259–68.
 74. Biron C. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr Opin Immunol.* 1997;9:24–34.
 75. Semple JW, Siminovitch K a, Mody M, Milev Y, Lazarus a H, Wright JF, et al. Flow cytometric analysis of platelets from children with the Wiskott-Aldrich syndrome reveals defects in platelet development, activation and structure. *Br J Haematol.* 1997;97(4):747–54.
 76. Tsuboi S, Nonoyama S, Ochs HD. Wiskott-Aldrich syndrome protein is involved in alphaIIb beta3-mediated cell adhesion. *EMBO Rep.* 2006;7(5):506–11.
 77. Prislowsky A, Marathe B, Hosni A, Bolen AL, Nimmerjahn F, Jackson CW, et al. Rapid platelet turnover in WASP(-) mice correlates with increased ex vivo phagocytosis of opsonized WASP(-) platelets. *Exp Hematol.* 2008;36(5):609–23.
 78. Haddad E, Cramer E, Rivière C, Rameau P, Louache F, Guichard J, et al. The thrombocytopenia of Wiskott Aldrich syndrome is not related to a defect in proplatelet formation. *Blood.* 1999;94(2):509–18.
 79. Badolato R, Sozzani S, Malacarne F, Bresciani S, Fiorini M, Borsatti A, Albertini A, Mantovani A, Ugazio AG NL. Monocytes from Wiskott-Aldrich Patients Display Reduced Chemotaxis and Lack of Cell Polarization in Response to Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine. *J Immunol.* 1998;161:1026–33.
 80. Linder S, Nelson D, Weiss M, Aepfelbacher M. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(17):9648–53.
 81. Ishihara D, Dovas A, Park H, Isaac BM, Cox D. The chemotactic defect in Wiskott-Aldrich syndrome macrophages is due to the reduced persistence of directional protrusions. *PLoS One.* 2012;7(1):1–9.
 82. Zhang H, Schaff UY, Green CE, Chen H, Sarantos MR, Hu Y, et al. Impaired integrin-dependent function in Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient murine and human neutrophils. *Immunity.* 2006;25(2):285–95.
 83. Binks M, Jones GE, Brickell PM, Kinnon C, Katz DR TA. Intrinsic dendritic cell

- abnormalities in Wiskott-Aldrich syndrome. *Eur J Immunol*. 1998;28(10):3259–67.
84. Burns S, Thrasher AJ, Blundell MP, Machesky L, Jones GE. Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood*. 2001;98(4):1142–9.
 85. Bouma G, Mendoza-naranjo A, Blundell MP, Falco E De, Parsley KL, Burns SO, et al. Cytoskeletal remodeling mediated by WASp in dendritic cells is necessary for normal immune synapse formation and T cell priming Cytoskeletal remodeling mediated by WASp in dendritic cells is necessary for normal immune synapse formation and T cell priming. 2011;118(9):2492–502.
 86. Parkman R, Rappeport J, Geha R, Belli J, Cassady R, Levey R, Nathan DG RF. Complete correction of the Wiskott-Aldrich syndrome by allogeneic bone-marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1978;298(17):921–7.
 87. Pai SY NL. Hematopoietic cell Advances, transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome: Treatment. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2010;30(2):179–94.
 88. Mazzolari E, Forino C, Guerci S et al. Long-term immune reconstitution and clinical outcome after stem cell transplantation for severe T-cell immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(4):892–9.
 89. Moratto D, Giliani S, Bonfim C, Mazzolari E, Fischer A, Ochs HD, et al. Long-term outcome and lineage-specific chimerism in 194 Wiskott-Aldrich Syndrome patients treated by hematopoietic cell transplantation between 1980 – 2009: an international collaborative study. *Transplantation*. 2011;118(6):1675–85.
 90. Morio T, Atsuta Y, Tomizawa D et al. Outcome of unrelated umbilical cord blood transplantation in 88 patients with primary immunodeficiency in Japan. *Br J Haematol*. 2011;154:363–72.
 91. Stepensky P, Krauss A, Goldstein G, Zaidman I, Elhasid R, Bielorai B, et al. Outcome of hematopoietic stem cell transplantation for wiskott-aldrich syndrome. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(2 SUPPL. 1):S231.
 92. YJ Barnes, RJ Hayashi, S Witty SS. Allogeneic transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome using a reduced intensity conditioning regimen. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2007;13(58).
 93. Gocho Y, Koh K, Kato M et al. Reduced-intensity stem cell transplantation is a promising therapeutic strategy for pediatric patients with Wiskott-Aldrich syndrome: a case series of 7 patients with a uniform reduced-intensity conditioning. Poster Present ASH Meet December 10–13, San Diego, CA Abstr 1950. 2011;
 94. Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S. History of gene therapy. *Gene*. 2013;525(2):162–9.
 95. Tatum E. Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. *Perspect Biol Med*. 1966;10(1):19–32.
 96. Rogers S PP. Use of viruses as carriers of added genetic information. *Nature*.

- 1968;219(5155):749–51.
97. Miller A. Retroviral vectors. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1992;158:1–24.
 98. Kiem HP, Andrews RG, Morris J et al. Improved gene transfer into baboon marrow repopulating cells using recombinant human fibronectin fragment CH-296 in combination with interleukin-6, stem cell factor, FLT-3 ligand, and megakaryocyte growth and development factor. *Blood*. 1998;92(6):1878–86.
 99. Tisdale JF, Hanazono Y, Sellers SE et al. Ex vivo expansion of genetically marked rhesus peripheral blood progenitor cells results in diminished long-term repopulating ability. *Blood*. 1998;92(4):1131–41.
 100. Rahdar M, McMahon MA, Prakash TP, Swayze EE BC and CD. Synthetic CRISPR RNA-Cas9-guided genome editing in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(51):E7110–7.
 101. Perez EE et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*. 2008;26:808–16.
 102. Hsu PD LE and ZF. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*. 2014;157(6):1262–78.
 103. Wang X, Huang X, Fang X, Zhang Y, Wang W. CRISPR-Cas9 System as a Versatile Tool for Genome Engineering in Human Cells. *Mol Ther Acids*. 2016;5(11):e388.
 104. Tabebordbar M, Zhu K CJ et al. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science (80-)*. 2016;22(351):407–11.
 105. Dai W-J, Zhu L-Y, Yan Z-Y, Xu Y, Wang Q-L, Lu X-J. CRISPR-Cas9 for in vivo Gene Therapy: Promise and Hurdles. *Mol Ther — Nucleic Acids*. 2016;5(8):e349.
 106. Frock RL, Hu J, Meyers RM, Ho Y, Kii E, Alt FW. Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. 2015;33(2):179–86.
 107. Ran FA, Cong L, Yan WX et al. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*. 2015;520:186–91.
 108. Kim D, Bae S, Park J, Kim E, Kim S, Yu HR, et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods*. 2015;12(3):237–43, 1 p following 243.
 109. Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, Foden JA, Thapar V, Reyon D, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. 2014;32(6):569–76.
 110. Wang X, Wang Y, Wu X, Wang J, Wang Y, Qiu Z, et al. Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors. *Nat Biotechnol*. 2015;33(2):175–8.
 111. Tycho J, Myer VE HP. Methods for optimizing CRISPR-Cas9 Genome editing specificity. *Mol Cell*. 2016;63:355–70.

112. Yu C, Liu Y et al. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2015;16:142–7.
113. Cyranoski D. CRISPR gene editing tested in a person. 24 novembro. 2016;479. <http://www.nature.com/news/crispr-gene-editing-tested-in-a-person-for-the-first-time-1.20988>.
114. Chicaybam L, Sodre AL, Curzio BA, Bonamino MH. An efficient low cost method for gene transfer to T lymphocytes. *PLoS One*. 2013;8(3):e60298.
115. Naldini L. ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nat Rev Genet*. 2011;12:301–15.
116. Dever DP, Bak RO, Reinisch A, Camarena J, Washington G, Nicolas CE, Pavel-Dinu M, Saxena N, Wilkens AB, Mantri S, Uchida N, Hendel A, Narla A, Majeti R, Weinberg KI PM. CRISPR/Cas9 β -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature*. 2016;539(7629):384–9.
117. Liang X, Potter J, Kumar S, Zou Y QR. Enhanced CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing by improved design and delivery of gRNA, Cas9 nuclease, and donor DNA. *J Biotechnol*. 2017;241:136–46.
118. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9 Prashant. *Science* (80-) [Internet]. 2013;339(6121):823–6. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23287722>
119. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA CE. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337:816–21.
120. Rouet P, F S, Jasin M. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:6064–8.
121. Smih F, Rouet J, Romanienko P, Jasin M. Doublestrand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*. 1995;23:5012–9.
122. Jasin M. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet*. 1996;12:224–8.
123. Dickinson DJ WJ et al. Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nat Methods*. 2013;10(10):1028–34.
124. Byrne SM, Ortiz L, Mali P, Aach J CG. Multi-kilobase homozygous targeted gene replacement in human induced pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res*. 2014;43(3).
125. Li K, Wang G, Andersen T, Zhou P PW. Optimization of Genome Engineering Approaches with the CRISPR/Cas9 System. *PLoS One*. 2014;9(8):e105779.
126. Beaton BP, Kwon DN, Choi YJ, Kim JH, Samuel MS, Benne JA, et al. Inclusion of homologous DNA in nuclease-mediated gene targeting facilitates a higher incidence of

- bi-allelically modified cells. *Xenotransplantation*. 2015;22(5):379–90.
127. Zhang J-P, Li X-L, Li G-H, Chen W, Arakaki C, Botimer GD, et al. Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. *Genome Biol*. 2017;18(1):35.
 128. Hasty P, Rivera-Pérez J, Bradley A. The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. 1991;11(11):5586–91.
 129. Xiquan Liang, Jason Potter, Shantanu Kumar, Yanfei Zou RQ, Mahalakshmi Sridharan, Jason Carte, Wen Chen, Natasha Roark SR, Namritha Ravinder JDC. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol*. 2009;208:44–53.
 130. Maurisse R, de Semir D, Enamekhoo H, Bedayat B, Adbolmohammadi A, Parsi H GD. Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages. *BMC Biotechnol*. 2010;10(9).
 131. Potter H, Heller R. Transfection by Electroporation. *Curr Protoc Mol Biol*. 2003;
 132. Chicaybam L, Barcelos C, Peixoto B, Carneiro M, Limia CG, Redondo P, et al. An Efficient Electroporation Protocol for the Genetic Modification of Mammalian Cells. *Front Bioeng Biotechnol*. 2017;4(January):1–13.
 133. Chicaybam L, Barcelos C, Peixoto B, Carneiro M, Limia CG, Redondo P, et al. An Efficient Electroporation Protocol for the Genetic Modification of Mammalian Cells. *Front Bioeng Biotechnol*. 2017;4:1–23.
 134. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001;105(3):369–77.
 135. Krause D. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Cell*. 2002;754–8.
 136. Genovese P, Schiroli G, Escobar G, Di Tomaso T, Firrito C, Calabria A, Moi D, Mazzieri R, Bonini C, Holmes MC, Gregory PD, van der Burg M, Gentner B, Montini E, Lombardo A NL. Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014;510:235–40.

APÊNDICE I

Sequência doadora *GFP/WAS*

Sequência completa de *GFP/WAS* (3892 pb)

GGATCCGGGAGGCAAGGGTAAGGGATGGGGAAGTGGACCAGAGGCATATGCGTCATTGGCAGTGTCTAAGCACTCACGATAGGC
 GTGGATCACAGGGGCTCGCTCTGTAATTAAGGAAAAGGGTTTTGTTGTGTTGTTGTTGTTGCTGTTTTGAGACAAGGGTCTTGC
 TCTGTATCATCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGCAGTCTCAGCTCACTGCAACCTCCGCCCTCGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCA
 GCCTCTGAGCAGCTAGGACTACAGGTGTGTGCCACCATGCCTGGCTAATTTTTGTATTTTTAGTGGAAATGGGGTTTTGCCATGTT
 GCCAGGCTCGTCTTGAACCTCTGACCTCAAGTGCATCCACTCGTCTCGCCCTCCCAAAGTCTGGGATTACAGGTGTGAGCTATTGTC
 CCCAGCCAAAAGGAAAAGTTTTACTGTAGTAACCTTCCGGACTAGGGACCTCGGGCCTCAGCCTCAGGCTACCTAGGTGCTTTAGA
 AAGGAGGCCACCCAGGCCATGACTACTCTTGGCACAGGGAGCCCTGCACACAGATGTGCTAAGCTCTCGTGCCAGCCAGAGGG
 AGGAGGGTCTGAGCCAGTCAAGAGAGATGGGCCCCAGAGAGTAAGAAAGGGGGAGGAGGACCCAAAGCTGATCCAAAAGGTGG
 GTCTAAGCAGTCAAGTGGAGGAGGGTTCCAACTGATGGCGGAGGGCCCAAGCTCAGCCTAACGAGGAGGCCAGGCCACCAAGG
 GGCCCTGGAGGACTGTTTTCCCTTAGATGGTGGAGCAAGGGCGCCGAGCTGTTACCCGGCATCGTGCCCATCTGATCGAGCTGA
 ATGGCGATGTGAATGGCCACAAGTTCAGCGTGAGCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCAT
 CTGCACCACCGGCAAGCTGCTGTGCCCTGGCCACCCTGGTGACCACCTGAGCTACGGCGTGCAGTGTCTCACGCTACCCCGA
 TCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGTACATCCAGGAGCGCACCATCTTCTCGAGGATACGGCA
 ACTACAAGTCGCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGGATACCCTGGTGAATCGCATCGAGCTGACCGGCCACCGATTTCAAGGAGGA
 TGCCAACATCCTGGGCAATAAGATGGAGTACAACACGCCCCACAATGTGTACATCATGACCGACAAGGCCAAGAATGGCATCA
 AGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGATGGCAGCGTGCAGCTGGCCGACCACTACCAGCAGAATACCCCATCGGCGAT
 GGCCCTGTGCTGCTGCCGATAACCACTACCTGTCCACCCAGAGCGCCCTGTCCAAGGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGATC
 TACTTCGGCTTCGTGACCGCCCGCCATCACCCACGGCATGGATGAGCTGTACAAGTCCGGCCGCTCTAGAGAAAAGCACCATGATG
 GGGGGCCCAATGGGAGGAAGGCCCGGGGGCCGAGGAGCACCAGCGTTTCAGCAGAACATACCCTCCACCCTCTCCAGGACCACG
 AGAACCAGCGACTCTTTGAGATGCTTGGACGAAAATGCTTGACGCTGGCCACTGCAGTGTTCAGCTGTACCTGGCGCTGCCCCCTG
 GAGCTGAGCACTGGACCAAGGAGCATTGTGGGGCTGTGTGCTTCGTAAGGATAACCCCAAGTCTACTTCCATCCGCTTTACG
 GCCTTCAGGCTGGTCCGCTGCTCTGGGAACAGGAGCTGACTCACAGCTTGTCTACTCCACCCACCCCTTCTTCCACACCTTCGC
 TGGAGATGACTGCCAAGCGGGGCTGAACCTTTCAGACGAGGACGAGGCCAGGCCCTTCGGGGCCCTCGTGAGGAGAAGATACAA
 AAAAGGAATCAGAGGCAAAGTGGAGACAGACGCCAGCTACCCCAACCAACACCAGCCAATGAAGAGAGAAGAGGAGGGGCTC
 CCACCCCTGCCCTGCATCCAGGTGGAGACCAAGGAGGCCCTCCAGTGGGTCCGCTCTCCCTGGGGCTGGCGACAGTGGACATCCA
 GAACCTGCATACAGTTCACGATACCGTGGGCTCCAGCACCTGGACCTAGCCAGCTGATAAGAAACGCTCAGGGAAAGAGA
 AGATCAGCAAAGCTGATATTGGTGACCCAGTGGATTCAAGCATGTGAGCCAGTGGGGTGGGACCCCAAGATGGATTTGACGTG
 AACAACTCGACCCAGATCTGCGGAGTCTGTTCTCCAGGGCAGGAATCAGCGAGGCCAGCTCACCGACGCCGAGACCTCTAAACTT
 ATCTACGACTTCATTGAGGACCAGGGTGGCTGGAGGCTGTGCGGCAGGAGATGAGGCGCCAGGAGCCACTTCCGCCGCCCCAC
 CGCCATCTCGAGGAGGGAACCAAGCTCCCGGGCCCTATTGTGGGGGTAACAAGGGTCTGTTCTGGTCCACTGCCCCCTGTACCTT
 TGGGGATTGCCCAACCCCAACACCCCGGGGACCCCAACCCAGGCCGAGGGGGCCCTCCACCACCACCCCTCCAGCTACTG
 GACGTTCTGGACCACTGCCCTCCACCCCTGGAGCTGGTGGGCCACCCATGCCACCACCACCGCCACCACCGCCACCGCCGCCCA
 GCTCCGGGAATGGACCAGCCCTCCCACTCCCTCCTGCTGCTGGTGCCTGCCGGGGCCCTGGCCCTGGTGGGGGTGGGGAGCG
 CTTTTGGATCAAATCCGGCAGGGAATTCAGCTGAACAAGACCCCTGGGGCCCCAGAGAGCTCAGCGCTGCAGCCACCACCTCAGAG
 CTCAGAGGGACTGGTGGGGCCCTGATGCACGTGATGCAGAAGAGAAGCAGAGCCATCCACTCTCCGACGAAGGGGAGGACCA
 GGCTGGCGATGAAGATGAAGATGATGAATGGGATGACTGACTTGTGGTTTTTGCATTTCTGTTCCCTTGTGCTCATTGCGGAAG
 TTCTCTTTACCTGCACCCAGAGCCTGCCAGAGAAGACAAGGGCAGAAAGCACCATGAGTGGGGGCCAATGGGAGGAAGG
 CCCGGGGCCGAGGAGCACAGCGGTTACAGAGAACATACCCTCCACCCCTCCAGGACCAGAGAACCAGCGACTTTTGAGAT
 GCTTGGACGAAAATGCTTGGTGGAGCTGGGGATCTCTGCCCCCGCCCGTCCCAACCGTTTTCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
 TCCCTCTCCCGCTCTCTCTTTCCCTCTCCATCATCT
 TACTTGCCTTCCCTCTGGCTGCAGCTCTTCTTTGGGCCATGACTGTCATGAGGCAGGAAGGACCAGGTCTGGCTCCAAGACCTTG
 TGGTACCCTGACCAGACTCCACTGACCCCTGCTTTCTCTCCAGACGCTGGCCACTGCAGTTGTTACAGTGTACCTGGCGCTGCC
 CCTGGAGCTGAGCACTGGACCAAGGAGCATTGTGGGGCTGTGTGCTTCGTGAAGGATAACCCCAAGTCTACTTTCATCCGCT
 TTACGGCCTTCAAGTACCCCAACCCCGACTGGACTTGAAGCCAGTCTCAACCCGCAACCCAGATCTGTGTCCATATGTGTC
 CATAGCTCAAGACCTCAGACCTGATCAGTGAATCCCTGAGCCCCAGAACCAAGACTCATCCAGATGGCAAACCTGACGGATCC,

APÊNDICE II

Artigo publicado:

An Efficient Electroporation Protocol For The Genetic Modification of Mammalian Cells

*Leonardo Chicaybam, Camila Barcelos, Barbara Peixoto, Mayra Carneiro, Cintia Gomez Limia,
Patrícia Redondo, Carla Lira, Flávio Paraguassú-Braga, Zilton Farias Meira De Vasconcelos,
Luciana Barros and Martin Hernán Bonamino*

Frontiers in Bioengineering and Biotechnology

January 2017 | Volume 4 | Article 99

doi: 10.3389/fbioe.2016.00099



An Efficient Electroporation Protocol for the Genetic Modification of Mammalian Cells

Leonardo Chicaybam^{1,2†}, Camila Barcelos^{1†}, Barbara Peixoto¹, Mayra Carneiro¹, Cintia Gomez Limia¹, Patricia Redondo^{3,4}, Carla Lira^{5,6}, Flávio Paraguassú-Braga⁵, Zilton Farias Meira De Vasconcelos⁶, Luciana Barros¹ and Martin Hernán Bonamino^{1,2*}

¹Programa de Carcinogênese Molecular, Coordenação de Pesquisa, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, Brazil, ²Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência, Rio de Janeiro, Brazil, ³Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, ⁴Centro de Transplante de Medula Óssea, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil, ⁵Banco de Cordão Umbilical e Placentário, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, Brazil, ⁶Instituto Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Zhanglin Lin,
South China University of Technology,
China

Reviewed by:

Zhaoyong Yang,
Chinese Academy of Medical
Sciences, China
Xueli Zhang,
Tianjin Institute of Industrial
Biotechnology (CAS), China
Marc Tancredi Facciotti,
University of California Davis, USA

*Correspondence:

Martin Hernán Bonamino
mbonamino@inca.gov.br

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Synthetic Biology,
a section of the journal
Frontiers in Bioengineering and
Biotechnology

Received: 04 September 2016

Accepted: 20 December 2016

Published: 23 January 2017

Citation:

Chicaybam L, Barcelos C, Peixoto B, Carneiro M, Limia CG, Redondo P, Lira C, Paraguassú-Braga F, Vasconcelos ZFMD, Barros L and Bonamino MH (2017) An Efficient Electroporation Protocol for the Genetic Modification of Mammalian Cells. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 4:99. doi: 10.3389/fbioe.2016.00099

Genetic modification of cell lines and primary cells is an expensive and cumbersome approach, often involving the use of viral vectors. Electroporation using square-wave generating devices, like Lonza's Nucleofector, is a widely used option, but the costs associated with the acquisition of electroporation kits and the transient transgene expression might hamper the utility of this methodology. In the present work, we show that our in-house developed buffers, termed Chicabuffers, can be efficiently used to electroporate cell lines and primary cells from murine and human origin. Using the Nucleofector II device, we electroporated 14 different cell lines and also primary cells, like mesenchymal stem cells and cord blood CD34+, providing optimized protocols for each of them. Moreover, when combined with sleeping beauty-based transposon system, long-term transgene expression could be achieved in all types of cells tested. Transgene expression was stable and did not interfere with CD34+ differentiation to committed progenitors. We also show that these buffers can be used in CRISPR-mediated editing of *PDCD1* gene locus in 293T and human peripheral blood mononuclear cells. The optimized protocols reported in this study provide a suitable and cost-effective platform for the genetic modification of cells, facilitating the widespread adoption of this technology.

Keywords: electroporation, cell line, MSC, T lymphocyte, CD34, transposon, CRISPR, PD-1, GFP

INTRODUCTION

Cell lines are valuable tools for research development, constituting one of the pillars of experimental biology. Their unlimited proliferative capacity, high degree of homogeneity, and relatively easy maintenance in culture allow the generation of large number of cells required for testing

Abbreviations: CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats; TALEN, transcription activator-like effector nucleases; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; MSCs, mesenchymal stem cells; GFP, green fluorescent protein; RFP, red fluorescent protein; 7-AAD, 7-amiactinomycin D; ITR, inverted terminal repeats; SB, sleeping beauty transposase; dpi, days post inoculation; gRNA, guide RNA; NHEJ, non-homologous end joining; FITC, fluorescein isothiocyanate; HSC, human stem cell.

numerous candidate drugs (Barretina et al., 2012), -omics profiling (Nishizuka et al., 2003; Griffin and Shockcor, 2004; Blower et al., 2007), and signaling pathways studies (Park et al., 2010), to cite some examples. One of the areas that benefited the most with the use of cell lines was cancer research, with the derivation of several cell lines that can be used as models for different cancers. These cells are used to model disease *in vitro* and *in vivo*, providing information about oncogenesis-related pathways and insights into therapeutic strategies (Gillet et al., 2013). Moreover, cell lines are central players in the biotechnology industry, being used in the production of biopharmaceuticals like antibodies, hormones, and bioactive proteins in general (Kuystermans and Al-Rubeai, 2015).

The use of cell lines in basic research is often associated with genetic modification protocols, which allow overexpression and/or silencing of desired genes in a controllable fashion. Recently, the development of gene editing tools like TALENs and CRISPRs provided a more precise control of gene insertion or deletion, extending the possible genomic manipulations (Kim and Kim, 2014). Methods to deliver foreign genetic material (DNA or RNA) usually rely in nonviral or viral vectors, with the former being preferred because of increased biosafety, easier production, and faster translation. Electroporation is a nonviral method for gene transfer that is demonstrating encouraging results, being successfully used for the manufacture of antitumor lymphocytes (Ramanayake et al., 2015) and other applications (Kotnik et al., 2015), but the mechanism of DNA/RNA transfer is not fully understood (Satkauskas et al., 2012). Moreover, the use of electroporation is associated with extensive testing of electric parameters (pulse amplitude, volts) in order to optimize the protocol. Nonviral methods like liposomes and electroporation show varying efficiencies, with several cell lines and primary cells showing poor transfection rates and cell death (Wang et al., 2012; Yin et al., 2014). In the case of liposomes, the transfection of non-adherent cell lines is rather inefficient, showing good results only for some adherent cells (Jordan and Wurm, 2004; Behr, 2012).

Using a square-wave pulse technology, Lonza's Nucleofector electroporator was shown to be very efficient in several cell lines and primary human and murine cells, inducing high expression of the transgene and substantial viability. The pre-loaded electroporation programs suited for each cell line simplify the experimental setup, and the use of proprietary additives improves the transfection efficiency. However, the frequent use of Nucleofector electroporation kits implies in important costs for research labs, especially those in middle- to low-income countries. In a previous work, our group developed "in house" electroporation buffers (termed "Chicabuffers") that had comparable efficiency with Lonza's buffers for the transfection of the human T cell line Jurkat and primary T lymphocytes from mouse and human origin (Chicaybam et al., 2013). Electroporation strategies using Chicabuffers were recently successfully applied to colon cancer cell lines (de Souza et al., 2013) and human mesenchymal stem cells (MSC; unpublished data). In the present work, we extend the efficiency analysis of Chicabuffers and the description of optimal electroporation conditions in a panel of cell lines and primary cells that represent relevant models for cell biology studies and

disease comprehension. We selected 14 cell lines of mouse and human origin and primary human cells [MSC, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), and cord blood CD34+ cells], showing that these buffers yield high transfection efficiencies and are a viable option for genetic modification using the Nucleofector IIB electroporator. For cells in which the levels of transgene expression was low, we developed sleeping beauty (SB)-based transposon plasmids engineered to confer drug resistance, allowing fast and efficient drug-based selection of cells representing fractions of the cell culture.

We selected cell lines representing models for hematopoietic neoplasias (HEL, K562, P815, Nalm-6, and Jurkat cell lines) and different solid tumor-derived cell lines (A-549, B16-F10, HeLa, MCF-7, MDA-MB-231). Some of the tested cells represent classical cellular models for ectopic gene expression (293T, NIH-3T3), cell signaling (Jurkat and 293T), growth factor dependence (BA/F-3), or simply relevant cells in terms of therapy and cell differentiation (MSCs, PBMCs and Cord Blood CD34+ cells). In addition, we show that the level of transfection achieved using Chicabuffers allows efficient genomic edition of the potentially clinical relevant PD1 locus in human cells, such as 293T and PBMCs, using the recently described CRISPR/Cas9 system (Jinek et al., 2012).

MATERIALS AND METHODS

Ethics Approval

The use of PBMCs and CD34+ cells from healthy donors was approved by an IRB (Brazilian National Cancer Institute—INCA—Ethics Committee—protocol 153/13), and donors signed review board approved informed consents. MSCs were obtained from healthy donors submitted to surgery for hernia repair at the Clementino Fraga Filho University Hospital. The patients provided written informed consent, and the study was approved by the Hospital Research Ethics Committee.

Plasmids and Cloning

The pT3-GFP plasmid (Peng et al., 2009) was kindly provided by Dr. Richard Morgan (Surgery Branch—NCI). The pT2-GFP and SB100X (Mátés et al., 2009) constructs were kindly provided by Dr. Sang Wang Han (UNIFESP, Brazil). For the creation of pT3-Neo-EF1a-GFP plasmid, GFP was excised from pT3-GFP by digestion with *AgeI/NotI*, and the neomycin resistance gene (NEO), which was synthesized by Genscript (Piscataway, NJ, USA), was inserted. The EF1a-GFP cassette was isolated from the plasmid pRRLsin.PPTs.EF1a.GFPpre (Bonamino et al., 2004) (provided by Dr. Didier Trono, EPFL, Switzerland) after digestion with *Clal/BstBI* and inserted in pT3-NEO previously digested with *Clal*. For CRISPR experiments, the plasmid encoding *S. pyogenes* Cas9 (WT) and a U6 promoter for guide RNA (gRNA) expression was acquired from Addgene (pX330; #42230). gRNA (CACCGGCCATCTCCCTGGCCCCCA) for programmed cell death 1 (*PDCD-1*) was designed by Optimized CRISPR Design tool (<http://crispr.mit.edu/>) and cloned in pX330 (Addgene) using *BbsI* restriction site. pRGs-CR (Kim et al., 2011) was provided by Dr. Amilcar Tanuri (Federal University of

Rio de Janeiro, Brazil), and *PDCDI* target sequence cloned in *EcoRI/BamHI* sites, between a red fluorescent protein (RFP) and a GFP, resulting in an out-of-frame GFP. The GFP expression can be restored by CRISPR-mediated non-homologous end joining (NHEJ) repair. All plasmids were isolated using Qiamp Maxi prep kit from Qiagen (Germany) and quantified using a Nanodrop spectrophotometer. The new constructs described in this report are available at Addgene.

Cell Lines and Primary Cells

The origin and cell culture conditions for each cell line are described in Table S1 in Supplementary Material. The use of PBMCs from healthy donors was approved by an IRB (Brazilian National Cancer Institute—INCA—Ethics Committee), and donors signed review board approved informed consents. Within 24 h after blood collection, leukocytes were harvested by filtration and washed with phosphate buffered saline (PBS). A density gradient centrifugation using Ficoll-Hypaque®-1077 was performed. Cells were centrifuged for 20 min at 890 *g* (slow acceleration/deceleration off), washed three times with PBS, and used for nucleofection. For CD34+ cells separation, mononuclear cells (MNCs) were isolated from umbilical cord blood after Ficoll density gradient using the same protocol above described. CD34+ cells were isolated from MNCs using CD34 MicroBead Kit (Miltenyi Biotech) following the manufacturer's instructions. The utilization of CD34+ cells was also approved by INCA's Ethics Committee.

Mesenchymal stem cells were isolated from abdominal subcutaneous adipose tissue fragments obtained from healthy donors submitted to surgery for hernia repair at the Clementino Fraga Filho University Hospital. The patients provided written informed consent, and the study was approved by the Hospital Research Ethics Committee. Fragments were cut into small pieces and incubated with 1 mg/mL collagenase type II (Sigma-Aldrich, MO, USA) under permanent shaking at 37°C for 30 min. The cell suspension was centrifuged at 400 *g*, room temperature, for 10 min, and the pellet was resuspended on PBS, followed by filtration with 100- μ m mesh strainers. Cells were plated to expand MSCs at 3×10^4 cells/cm² density with low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM Low-glucose, Gibco, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, CA, USA) and 100 U/ml penicillin and 100 μ g/mL streptomycin (Sigma-Aldrich, MO, USA). Cells were electroporated at passage 3.

Electroporation

Generic cuvettes were used for all the electroporations (Mirus Biotech®, Madison, WI, USA cat.: MIR 50121). Cells were resuspended in 100 μ l of the desired buffer, and 4 μ g of the reporter plasmid (pT2-GFP transposon) were added. For long-term experiments, 1 μ g of SB100 \times was added. The seven different buffers tested in this work are described in Table S2 in Supplementary Material. Cells were transferred to a sterile 0.2-cm cuvette and electroporated using the reported program (Table 1) of Lonza® Nucleofector® II electroporation system. After transfection, cells were gently resuspended in 1 mL of pre-warmed RPMI medium supplemented only with 2mM

L-Glutamine and 20% FCS. All cells were seeded in 12-well plates and grown at 37°C and 5% CO₂. The medium was replaced by complete RPMI medium the following day, and cells were maintained as described previously.

Electroporation Score Determination

For non-adherent cell lines, viability determination was based on trypan blue exclusion and/or determination of the % of cells displaying viable cell FSC vs. SSC parameters by flow cytometry analysis on cells negative after 7AAD staining. For adherent cells, viability determination was calculated based on the % of the OD obtained in Crystal Violet staining assays at d + 1 or d + 3. Calculation was based on the formula $\% = 100 \times [\text{OD for control (non-electroporated) cell line} / (\text{OD for control (non-electroporated) cell line} + \text{OD for electroporated cell line})]$. The "electroporation score" was calculated based on cell viability (after normalization against the viability of non-transfected cells) and transgene expression on d + 1, and the score set to the formula "Viability (%) * Expression (%) / F". A division factor ($F = 50$ for adherent cell lines and $F = 100$ for non-adherent cell lines) was used in the score formula to fit the results in the graph scale.

Crystal Violet Staining

To assess viability of adherent cell lines, cells were plated in triplicate in 96-well microtiter plates immediately after electroporation. Cell viability was evaluated after 24 h, and cell expansion was analyzed at day + 1 by crystal violet. The crystal violet incorporation assay was performed by fixing the cells with ethanol for 10 min, followed by staining them with 0.05% crystal violet in 20% ethanol for 10 min and solubilization with methanol as reported (Faget et al., 2012). The plate was read on a spectrophotometer at 595 nm (SpectraMax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

In Vivo B16-F10 Tumor Model

B16F10 cells were electroporated with 4 μ g of pT3-NEO-EF1a-GFP and 1 μ g of SB100 \times in buffer 1S, program P-020 of Lonza Nucleofactor II. As negative controls, we electroporated cells only with pT3-NEO-EF1a-GFP. Each condition was plated in a 6-well plate. After reaching 80% confluence, G418 (Life Technologies) antibiotic was added at 2,000 μ g/mL. The medium was changed every 3 days and the antibiotic added. After selection with antibiotic or not, we injected 5×10^5 cells in the left flank of C57BL/6 mice. After 15 days, we excised the tumor and plated the cells in 25 cm² culture flasks. After 24 h, the culture medium was changed to eliminate non-adherent cells. After 3 days, the cells were recovered and analyzed by flow cytometry for GFP expression.

CD34+ Differentiation Assay

Electroporated CD34+ cells were assayed in two different concentrations, 5×10^3 and 2×10^3 cells/well. The cells were concentrated in 300 μ L and then added in 1.1 \times concentrated 3 mL Methocult™ H4034 (Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada), then seeded two wells of a six-well plates, 1.1 mL/well. Cells were cultivated for 3 weeks at 37°C in a humidified

TABLE 1 | Summarized electroporation conditions for each cell line (based in Figure 2; d1 after electroporation).

Cell line	Cell type	Program	Recommended buffer	Viability (Chicabuffer ± SD) (%)	Viability (Lonza) (%)	GFP expression (Chicabuffer) (%)	GFP expression (Lonza) (%)
Non-adherent							
BA/F3	Mouse pro B cell	X-001	2M	91.8 ± 2.7	79.00	55.05 ± 14.2	88.00
HEL	Erythroleukemia; erythroblast cell	X-005	1S	70.4 ± 17.1	39–66	79 ± 6.2	94.00
Jurkat	Acute T cell leukemia; T lymphocyte; lymphoblastoid cells	X-001	1SM	75.7 ± 6.8	90.00	69 ± 11.6	88.00
K562	Human chronic myelogenous leukemia; lymphoblastoid cells	T016	1M	70.7 ± 13.8	88.00	64.1 ± 8	80–90
Nalm-6	Human B cell precursor leukemia	C-005	3P	74.2 ± 11.8	87.00	40.6 ± 14.7	64.00
P815	Mouse mastocytoma; mast cells	C-005	3P	70.2 ± 29.9	92.00	60.5 ± 16.6	62.00
Adherent							
A549	Human lung carcinoma; epithelial cells	X-001	3P	59.4 ± 27.3	81.00	63.5 ± 11.4	72.00
293T	Human embryonal kidney; adherent fibroblastoid cells	A-023	1SM	79.9 ± 24.7	90.00	38.6 ± 30.2	90.00
B16F10	Mouse skin melanoma	P-020	2S	39.9 ± 17	91.00	49.3 ± 15.7	84.00
HeLa	Human cervix carcinoma; epitheloid cells in monolayers	I-013	1M	45.1 ± 16.5	85–90	66.4 ± 8.3	70.00
MCF7	Human breast adenocarcinoma; epithelial cells	P-020	1M	68.4 ± 10.9	60.00	57 ± 23.3	77.00
MDA-MB-231	Human breast adenocarcinoma; epithelial cells	X-013	1SM	85.6 ± 15	77.00	48.5 ± 17.5	79.00
human MSCs	Human mesenchymal stem cell	U-023	2S	58.5 ± 6.8	48.00	35 ± 16.6	80.00
NIH3T3	NIH Swiss mouse embryo; adherent fibroblastoid cells	U-030	1SM	49.4 ± 30.4	87.00	52.5 ± 19.5	84.00

atmosphere supplemented 5% CO₂ in incubator 300/3000 Series (Revco, OH, USA). The colonies were identified and quantified using STEMvision™ (Stem Cell Technologies, Inc.) for the burst-forming units-erythroid, colony-forming units-erythroid, colony-forming units-granulocyte or macrophage or granulocyte-macrophage, and colony-forming units-granulocyte/erythroid/megakaryocyte/macrophage.

Flow Cytometry

FACSCalibur® (BD Bioscience) was used to perform morphologic evaluation of viability (FSC vs. SSC) and GFP expression analysis. Cells were harvested the following days after transfection and resuspended in PBS at a concentration of 10⁵ cells/500 µL. 7AAD staining (eBioscience cat. 00-6693) was performed immediately before FACS acquisition following manufacturer instructions. Data were analyzed using the FlowJo software (Tree Star). The hematopoietic progenitor CD34+ cells were evaluated for purity by staining with anti-CD34-PE (clone 581, BD Biosciences).

CRISPR-Mediated Gene Editing

HEK293FT and PBMCs were electroporated with pX330-PDCD-1 (10 µg) and pRGS-CR-target (5 µg). Gene editions were evaluated by GFP+/RFP+ ratio after 24 h by flow cytometry. To characterize indels at *PDCD1* locus, genomic DNA of gene edited cells was isolated by phenol-chloroform. Amplification of the target region was performed by PCR using the forward 5'-CCCCAGCAGAGACTTCTCAA and the reverse 5'-AGGACCGGCTCAGCTCAC primers. The PCR fragment was ligated in pCR2.1 vector (TA Cloning® Kit, Life Technologies), transformed in DH5α cells and single bacteria

colonies has the plasmid DNA extracted and sequenced using the primers described above.

Short RNA and Plasmid Co-Electroporation

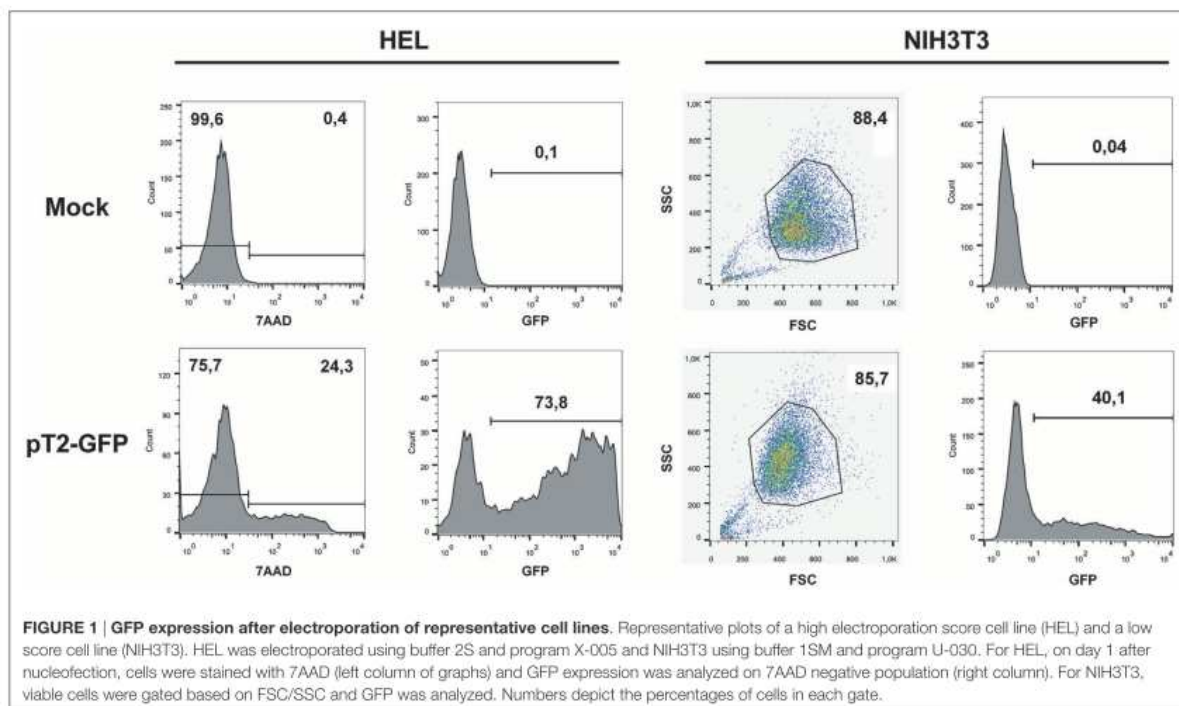
After Ficoll gradient purification, PBMCs (10⁷ cells) were electroporated with pRGS-CR-target (10 µg) and 10–50 pmol of FITC labeled RNA (Invitrogen) in Chicabuffer 3 P and U-014 Nucleofector IIb program. Cells were left resting in RPMI + 10%FCS for 24 h at 37°C and 5% CO₂ and then evaluated by flow cytometry using ACCURI C6 (BD Bioscience).

Statistical Analysis

Data from electroporation experiments were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test using GraphPad Prism 6 software.

RESULTS

With the objective of determining the best-suited buffer for the electroporation of each cell line, cells were electroporated with seven different buffers and the viability and GFP expression were analyzed. Representative flow cytometry plots are depicted in **Figure 1**, showing 7AAD staining and GFP signal (gated in 7AAD negative cells) for a high electroporation score cell line (HEL) and FSC/SSC and GFP signal for a low score cell line (NIH3T3). 7AAD staining was performed only in the non-adherent cells since they represent a mixture of viable and non-viable cells at day 1 post electroporation. Adherent cells were allowed to adhere overnight after electroporation, and non-adherent/dead cells

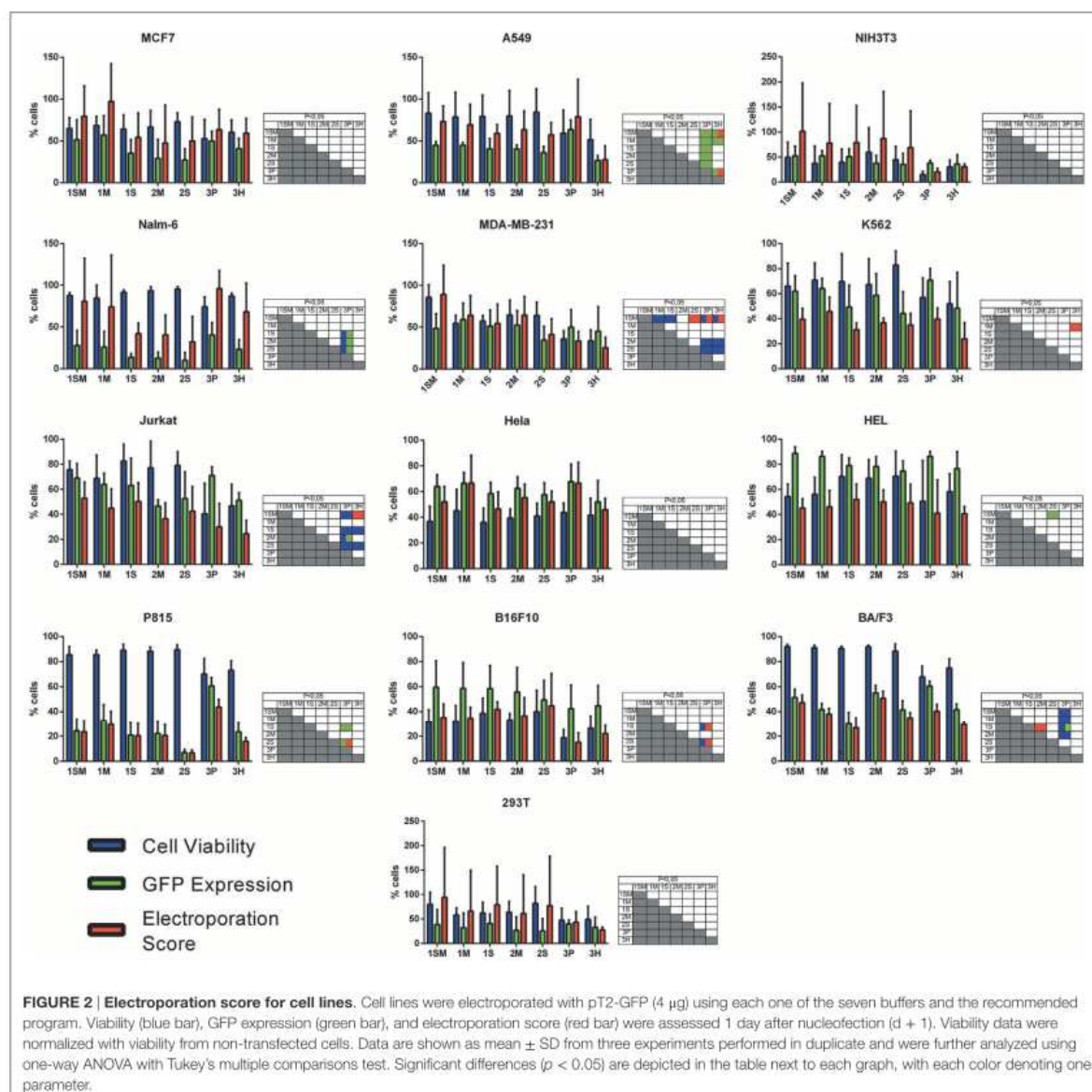


were discarded before FACS analysis. As showed in **Figure 2**, the majority of cell lines showed high electroporation scores independent of the buffer, with exception of P815, which showed an overall low efficiency but demonstrated best performance with buffer 3P. Suspension cell lines showed the best results regarding GFP expression, in which values above 60% were recurrently obtained. One exception is Nalm-6, with a maximum of 40% of GFP-positive cells obtained using buffer 3P. Adherent cell lines showed GFP values slightly lower (30–65%), with Hela showing the best result with $66.4 \pm 8.3\%$ of GFP expression using buffer 3P. Importantly, after 24 h of electroporation, the cells showed a good viability (**Figure 2**), allowing expansion and recovery from the nucleofection. Viability and GFP expression were followed for 10 days (suspension cell lines) or 7 days (adherent cell lines), with some cells retaining high levels of GFP (K562, HEL, B16F10) and others showing low expression of the marker after the expansion (NIH3T3, Jurkat, P815) (Figures S1–14 in Supplementary Material). These results probably reflect the observed differences in nucleofection efficiency and proliferation rates among the studied cells. The electroporation protocol for each cell line is summarized in **Table 1**.

Stable gene expression is often required in the experimental setting, allowing the generation of subclones with overexpression or silencing of a gene of interest. The emergence of nonviral vectors that allow the integration of transgenes, like the SB transposon system, simplified the genetic modification of cells, requiring only the delivery of two plasmids to achieve stable expression (one encoding the transgene flanked by ITRs—inverted terminal

repeats—and one encoding the transposase). In order to evaluate if Chicabuffers could be used with this system, 1 μg of SB100 \times (encoding a hyperactive version of the SB transposase) was electroporated with 4 μg of pT2-GFP and GFP expression was followed for 30 days. As showed in **Figure 3**, the addition of SB100 \times induced a higher percentage of GFP-positive cells after 30 days of culture when compared with control cells, strongly suggesting that integration of the transgene has occurred. This effect was more pronounced in B16F10, HeLa, and MCF7 cell lines, with approximately 20% of GFP-positive cells at day 30. The other cell lines showed only a modest increase in GFP-positive cells at day 30, ranging from 2% (BA/F-3) to 12% (K562). The long-term levels of GFP expression did not correlate with GFP expression at early days after nucleofection, suggesting that the cell lines have different intrinsic susceptibilities to SB-induced transgene integration.

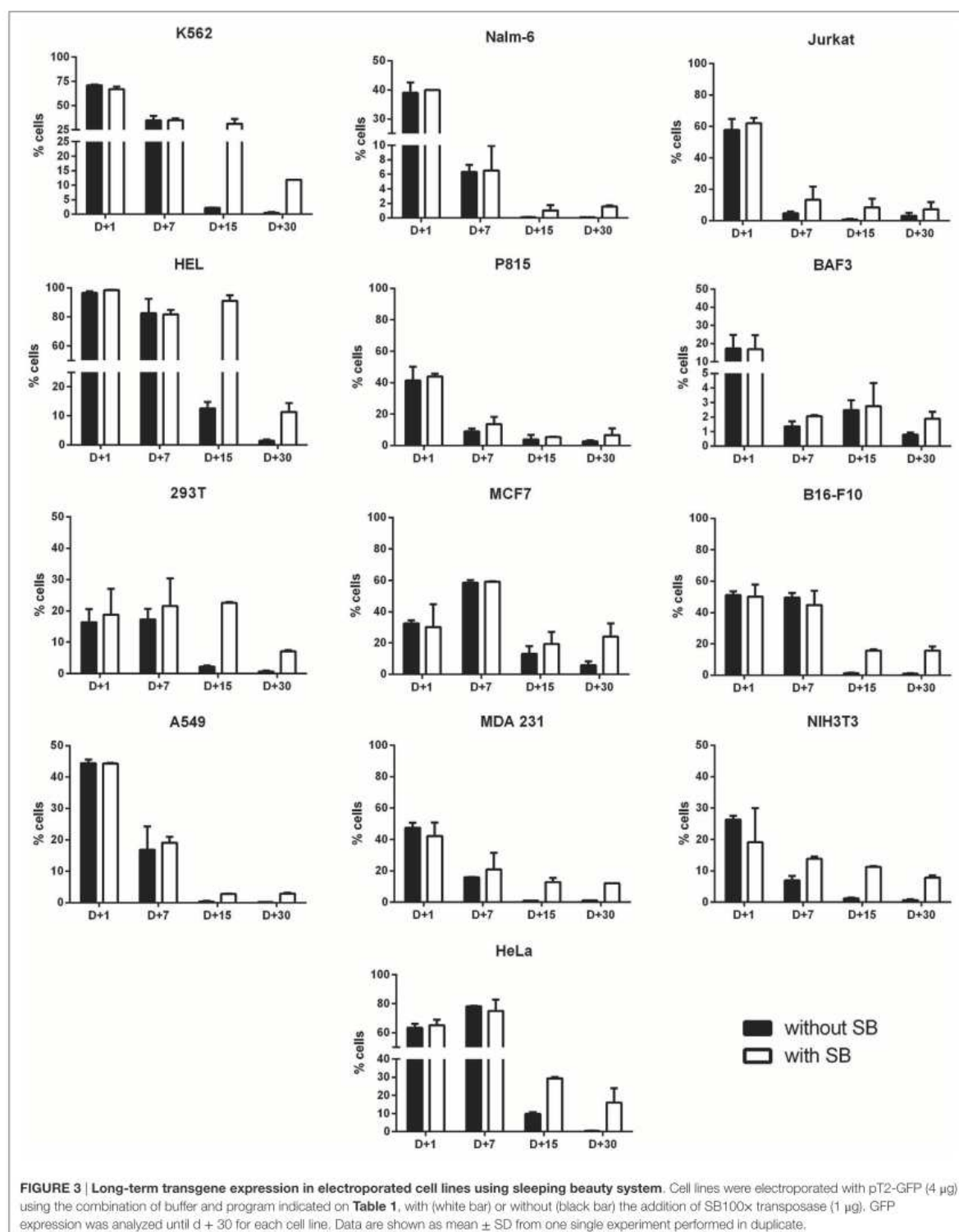
For fast and easy enrichment of GFP-positive cells, we constructed a bidirectional vector encoding GFP and G418 resistance in the backbone of pT3 transposon, named pT3-Neo-EF1a-GFP. Indeed, the expression level obtained after nucleofection was sufficient to select G418-resistant clones after electroporation with this plasmid, as shown for NIH3T3 (**Figure 4A**) and B16F10 (**Figure 4B**) cell lines. After G418 selection and withdrawal, GFP expression remained stable in NIH3T3 cells for 15 days (**Figure S15** in Supplementary Material). Furthermore, when the modified B16F10 cells were injected *in vivo* and allowed to form subcutaneous tumors, the cells extracted from the tumor at d + 14 post inoculation (dpi) still expressed high levels of

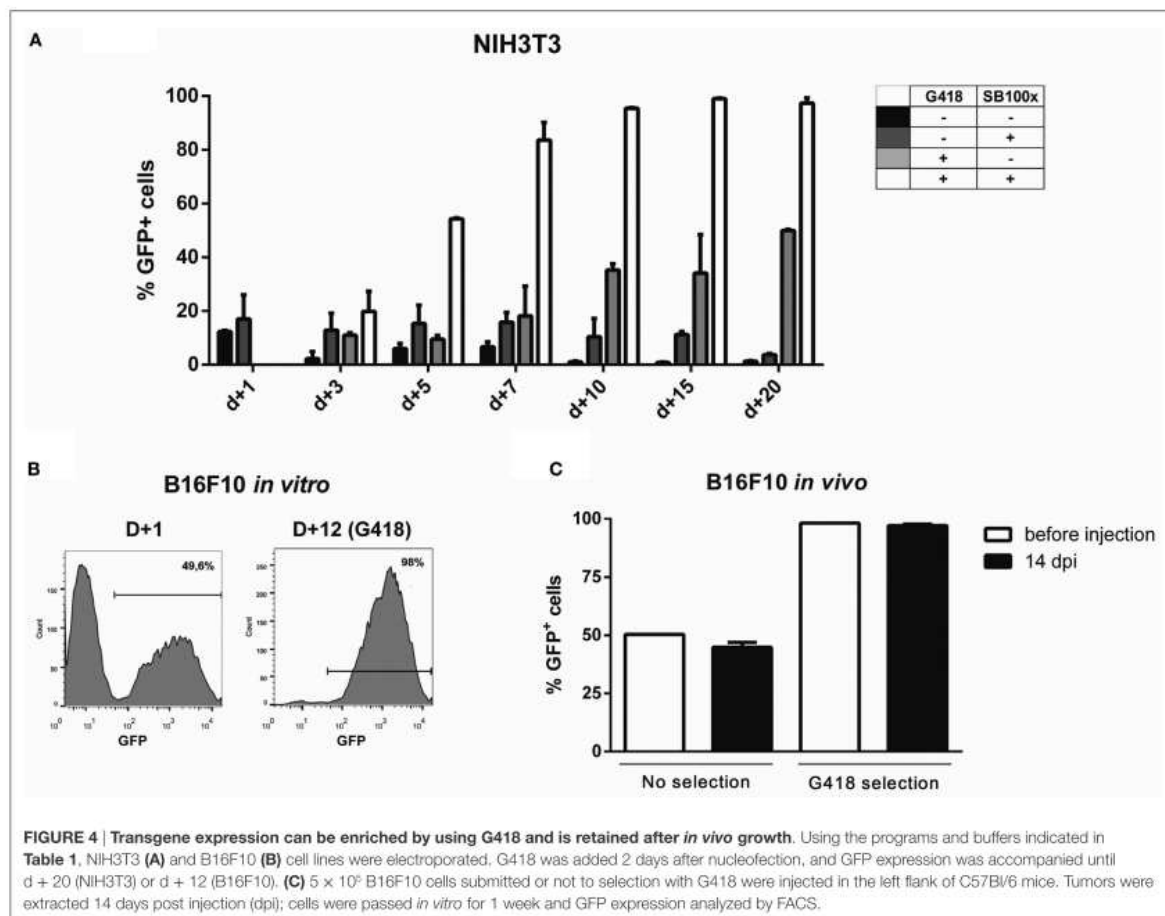


GFP, indicating that the transgenic cassette is integrated in the genome and has stable expression, with no signs of *in vivo* silencing of the transgene (Figure 4C; Figure S16 in Supplementary Material).

Variations of the pT3-Neo-EF1a-GFP construct were developed, such as the pT3-Neo plasmid, which confers resistance to G418 antibiotic and has restriction sites that allow cloning of a second expression cassette. This plasmid was validated in G418 resistance assays using B16F10 cells (data not shown). The map for this plasmid is shown in Figure S18 in Supplementary Material.

The use of primary cells derived from patients or healthy donors provides a more accurate model for *in vitro* and *in vivo* experiments, and these cells can also be used in cell therapy approaches to treat a large number of diseases. However, these applications often depend on genetic modification, which is usually hard to perform in these cells. To evaluate the performance of Chicabuffers in the gene transfer to these cells, we isolated adipose tissue derived MSCs and cord blood purified CD34+ hematopoietic stem cells and electroporated the cells with the plasmids pT2-GFP and SB100x. As shown in Figure 5A, the best electroporation score for MSC was obtained using buffer





2S, with 57% of viable cells and 39% of GFP expression. When using SB100x, long-term expression of GFP using this buffer was seen in 12% of cells (**Figure 5B**). For CD34 + cells, around 57% were GFP-positive 1 day after electroporation using buffer 1SM and program U-008 (**Figure 6A**). These cells were plated in methylcellulose-based medium, allowing long-term assessment of GFP expression and differentiation potential. After 3 weeks, GFP+CD34+ cells were able to differentiate to erythroid, granulocytic, and myeloid lineages (**Figure 6B**), showing that the insertion of the transgene did not affect the stemness of the cells and that differentiated cells display high GFP expression (Figure S17 in Supplementary Material).

The recent description of the CRISPR/Cas9 system as an efficient tool to edit the genome of cells has clear implications for basic cell biology studies and gene therapy protocols (Doudna and Charpentier, 2014). To achieve efficient gene editing of target cells, Cas9 nuclease and the gRNA must be expressed in the cell, ideally in a transient fashion. To evaluate the efficiency of Chicabuffers in promoting Cas9-mediated genome editing, we designed a gRNA targeting exon 2 of *PDCD1* gene, which

encodes the inhibitory receptor PD-1, a relevant potential target for cancer cell-based immunotherapy (Hamid et al., 2013; Chicaybam and Bonamino, 2014). For the validation of gRNA, we used plasmid pRGS-CR-PDCD1, which has the *PDCD1* target sequence cloned between a RFP and a GFP, resulting in an out-of-frame GFP. In this system, GFP expression can be restored by CRISPR-mediated NHEJ repair (Kim et al., 2011), leading to restoration of the reading frame in nearly 1/3 of the editions. Co-electroporation of 293T cells with the report construct and the plasmid carrying CRISPR/Cas9/gRNA, but not CRISPR/Cas9 lacking the gRNA sequence, resulted in GFP expression in approximately 7% of the RFP+ cells (3% out of 42%), indicating that sequence-specific DNA editing was achieved (**Figure 7A**). A similar approach was performed in PBMCs and following electroporation, indels were verified by amplification of *PDCD1* locus of the edited cells, which was subsequently cloned in pCR2.1 vector and analyzed by Sanger sequencing, evidencing cells containing indels of varying lengths in the *PDCD1* locus (**Figure 7B**). The results of gene editing experiments in 293T and PBMCs are summarized in

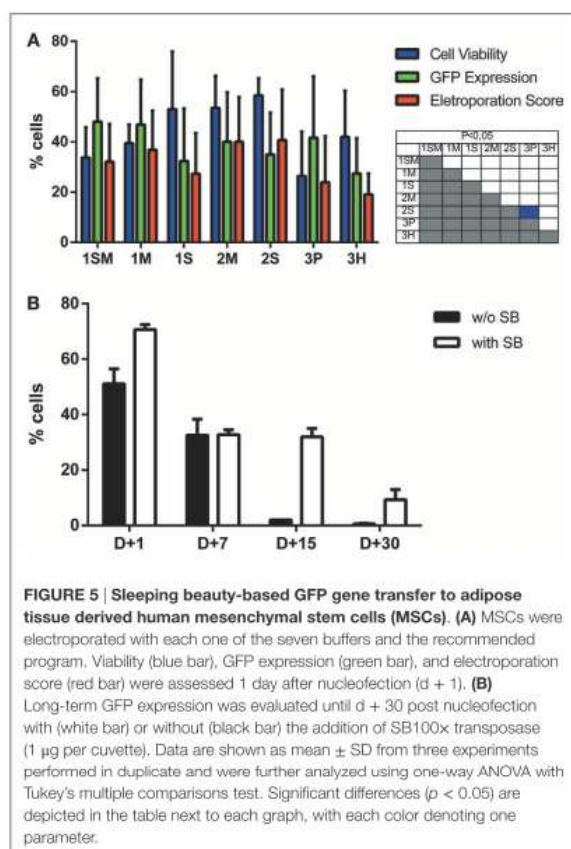


Figure 7C. The characterization of indels in PBMCs and 293T cells indicate that the use of our optimized electroporation protocol allowed efficient editing of *PDCD1* locus in the tested samples. All the indels led to disruptions of the reading frame of the PD1 sequence (data not shown).

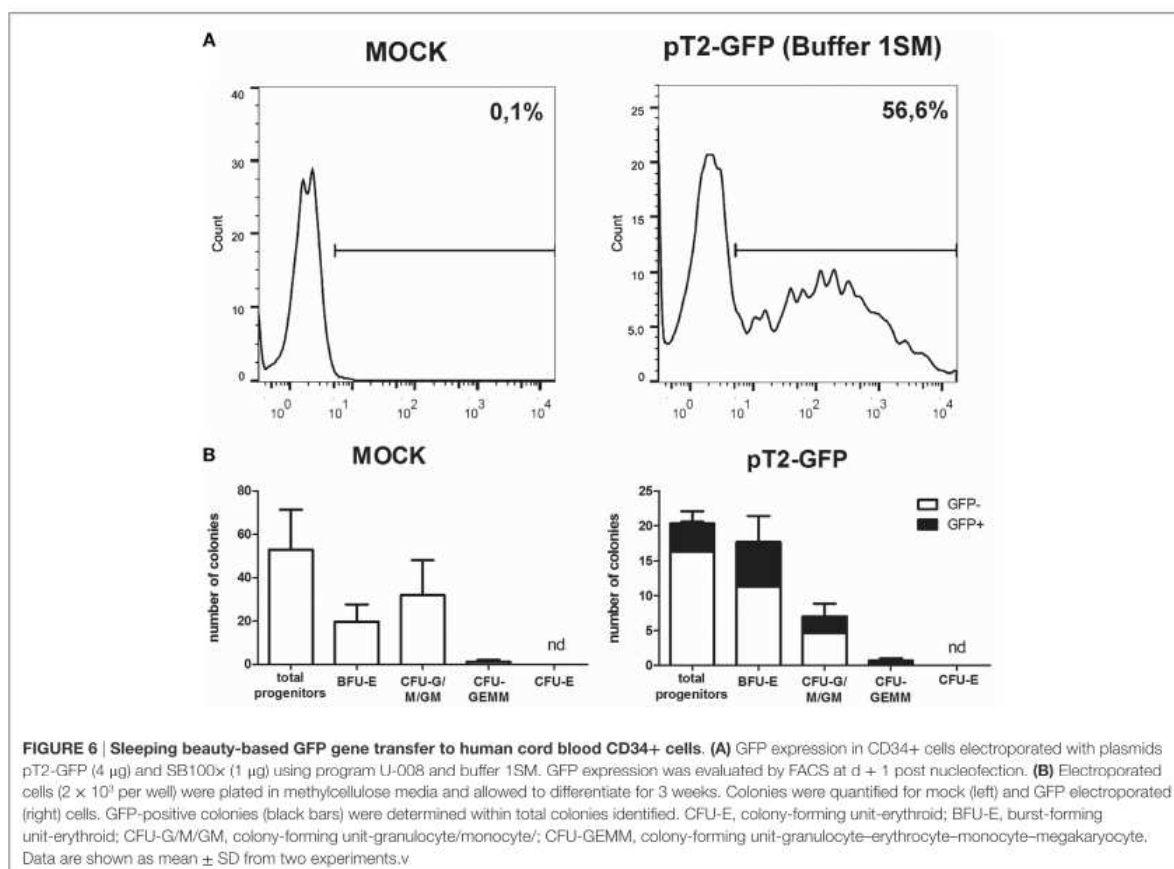
Multiple target editing is possible using CRISPR systems. Since multiple loci editing require multiple gRNA, we evaluated the possibility of co-electroporating PBMCs with a reporter plasmid and FITC labeled short RNAs. This setting could be used to co-electroporate a plasmid encoding a reporter gene (or Cas9 nuclease) and multiple short RNAs (such as gRNAs for editing several loci). Using the buffer 3P we were able to achieve high viability (Figure S19A in Supplementary Material) and up to 60.7% of cells expressing the short RNA when 50 pmol of the RNA were used (Figure S19B in Supplementary Material). Concentrations above 75 pmol of short RNA resulted in increased cell death and were not further used (data not show). From electroporated cells under the same condition, up to 14.8% co-expressed the reporter plasmid (encoding RFP) and the labeled short RNA (Figure S19C Supplementary Material). This setting clearly allows efficient co-electroporation of plasmid DNA and short RNA, opening the possibility of combining siRNA and transgene expression or even multiple gRNAs and Cas9 expressing plasmids for gene editing.

DISCUSSION

Genetic modification of cells is a cumbersome and expensive process, often involving the use of viral vectors to achieve high efficiency transgene expression. The use of electroporation for the genetic modification of cells is being adopted by many laboratories as it represents a fast and cheap option for transfer of plasmids and RNA. Moreover, this technique is also very efficient, inducing transgene expression levels comparable to viral vectors in some cells (Bilal et al., 2015). Equipments capable of generating square-wave voltage pulses, like Lonza Nucleofector, are among the most efficient for mammalian cell electroporation (Mir, 2014). However, costs associated with the acquisition of nucleofection kits, especially if used in a routine basis, might hamper the use of this technology in some laboratories or impair large-scale experiments.

In a previous work, our group described seven in house buffers and tested the electroporation efficiency of Jurkat cells and primary lymphocytes using Nucleofector (Chicaybam et al., 2013). The selected buffers induced high transgene expression and low toxicity, comparable to results obtained when Lonza's kit were used. In this context, the present work comprises a practical guide for the electroporation of 14 cell lines and primary MSCs and HSCs, determining the best buffer (among seven options) to be used with Lonza Nucleofector II, a widely disseminated electroporation device. The electroporation score calculated for every cell line is a general guide for electroporation efficiency comparison, and the buffer choice can be adapted to the need of the planned experiment (higher GFP expression or cell viability), allowing the researcher to experiment with different transgene expression levels. Chicabuffers showed to work for all the cells tested with most of the samples showing interchangeable results among the different buffers and only few exceptions where one of the buffers performed poorly or GFP expression was improved at the expense of cell viability, such as for buffer 3P in Jurkat cells. This illustrates that privileging GFP expression, for instance, can be detrimental to cell viability, opening room to further improvements in the electroporation protocol or buffer formulations. This results place Chicabuffers as a valuable tool for cheap and fast gene modification of basically every cell tested, with important potential applications in cell therapy and development and testing of synthetic circuits in mammalian cells. Although we focused in Lonza's device, it is likely that a similar approach using these buffers in conjunction with electroporators that allow modification of electroporation conditions could achieve even better results by fine tuning parameters like pulse amplitude, voltage, and wave forms (Yarmush et al., 2014). Lonza's buffers were already described to have good results when tested with alternative nucleofector IIb programs (Gresch et al., 2004), suggesting that there is still room for optimization of electroporation conditions, reinforcing the potential of testing Chicabuffers under different experimental settings.

Short-term viability and expression of GFP was very efficient for the majority of cell lines, and Chicabuffers performed equally well when compared to the results reported by Lonza, especially for non-adherent cell lines (Table 1 and Figure 2). Furthermore,

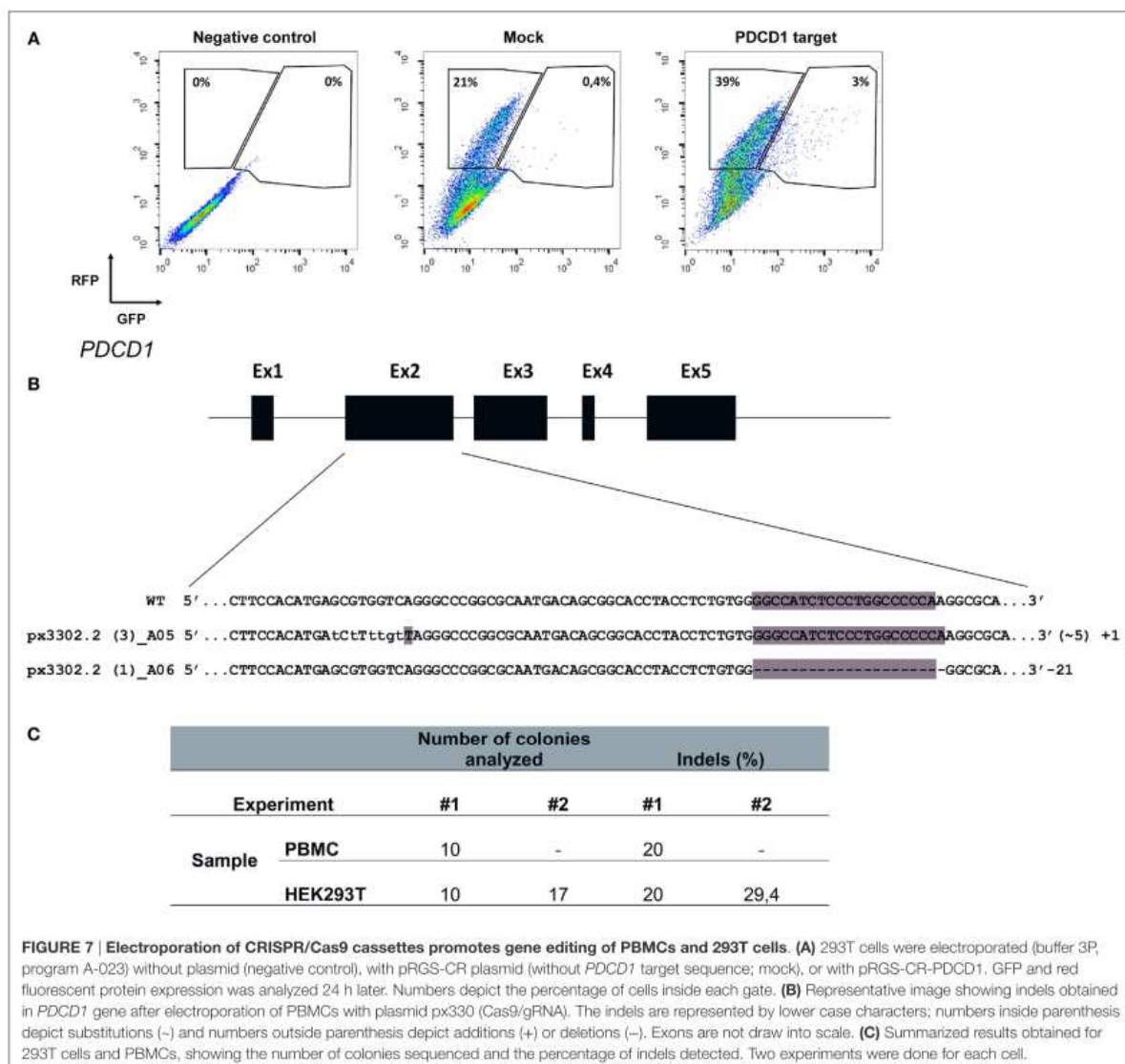


our results are comparable to those reported in the literature for cell lines like K562 (Gresch et al., 2004) and primary MSCs (Aluigi et al., 2006), although direct comparison of the results must be taken carefully because different plasmids were used. By combining this strategy with the SB transposon system, the provided optimized protocols allowed long-term expression of transgenes in all the cells tested (Figure 3). In the case of viral vectors, especially retroviral and lentiviral vectors, there is a wide availability of constructs carrying selectable markers, fluorescent reporters, promoters for different finalities, and cassette configurations, increasing the options of possible cellular manipulations (Szulc et al., 2006; Weber et al., 2008; Vargas et al., 2012). This is in sharp contrast to the SB system, which has a limited offer of transfer plasmids available. The new vectors developed and validated in the present report can improve flexibility and increase the applicability of this system, promoting accessible and efficient transgene integration into different cell types. These plasmids showed high and stable levels of transgene expression, and the addition of antibiotic resistance allowed the selection of GFP-expressing clones *in vitro*. Long-term expression of the transgene can be potentially increased by the use of SB100x RNA, decreasing the toxicity of the electroporation process as reported (Peng et al., 2009), or by carefully titrating

the transposase plasmid mass to avoid overproduction inhibition (Grabundzija et al., 2010). These vectors and others recently reported in the literature (Kowarz et al., 2015), in conjunction with Chicabuffers, could be potentially used in diverse experimental gene therapy approaches, such as T cell immunotherapy (Singh et al., 2015), MSCs (Martin et al., 2014), and stem cell gene therapy protocols (Aiuti et al., 2013), further facilitating the application of these technologies in basic, translational, and clinical studies.

Our results show the feasibility of this approach, enabling a stable transgene expression in CD34+ cells from cord blood samples, keeping GFP expression throughout hematopoietic differentiation. It would be interesting to test this strategy in stem cell differentiation models other than the hematopoietic system such as the central nervous system (Sartore et al., 2011), including models of *in vivo* differentiation. In addition, cells with clear therapeutic potential, such as T lymphocytes (Chicaybam et al., 2013) and MSCs (this report) could be stably modified using a combination of Chicabuffer, SB, and electroporation.

Sleeping beauty-mediated modification of cells as described here proved to be stable *in vitro* and *in vivo*, with cells retaining transgene expression during tumor development in immunocompetent mice. The GFP+ B16F10 cells not only retained GFP



expression level, but also kept a constant ratio of GFP+/GFP- cells throughout the 15-day period of *in vivo* tumor development. This result suggests that no gene silencing occurs for the SB transgenic cassette, supporting *in vivo* utilization of this tool, as described elsewhere (Belur et al., 2003; Hausl et al., 2010).

Furthermore, we showed efficient CRISPR-mediated genome editing of *PDCD1* gene in 293T and human PBMCs electroporated using Chicabuffers. Designing a single plasmid encoding Cas9+gRNA is simpler than constructing zinc finger nuclease (Beane et al., 2015) or TALEN (Berdien et al., 2014)-based cassettes. The single plasmid approach for BMC edition is also simpler to assemble than the recently reported Cas9+gRNA ribonucleoproteins (Schumann et al., 2015), showing that our extremely simple

protocol can be used to edit cell genomes. The gRNA used for *PDCD1* locus edition in our report targets exon 2, in contrast to exon 1 editions promoted by Schumann et al. (2015), showing that different gRNAs can be used to efficiently disrupt the *PDCD1* gene sequence. The levels of gene editing obtained with our approach allow similar downstream applications in primary lymphocytes as those proposed by the above mentioned reports, but with a reduced effort to design the gene editing tool (plasmid bases CRISPR system vs. TALEN or ZFN) or the electroporation reagents (plasmid vs. RNA + protein). Furthermore, the protocol described for the co-electroporation of short RNAs and plasmids carrying GFP+ Cas9 can be exploited for multiple loci editing in PBMCs, opening the possibility of targeting simultaneously

several genes of interest. These results suggest that Chicabuffers can be used for CRISPR genome editing in different cell lines and primary cells, including large-scale screening of different gRNAs.

In summary, our study describes general guidelines for the efficient electroporation of primary mammalian cells and several cell lines. For cell lines not described in this study, Chicabuffers represent a good starting point for the optimization of electroporation protocol and facilitate the genetic modification of cell lines that are not frequently used. Furthermore, our data validate a series of flexible SB-based plasmids for the integration of transgenes and downstream selection of gene-modified cells. The combination of transposon, Chicabuffers, and electroporation, as described here, represents a straightforward approach for transient gene expression and permanent gene modification of cell lines and human primary cells.

ETHICS STATEMENT

The study was approved by the local Research Ethics Committees.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LC, CB, BP, MC, PR, and LB performed the electroporation experiments (cell lines, MSCs, and PBMCs) and data analysis and interpretation. CGL, CL, FP-B, and ZV performed electroporation and differentiation experiments in CD34+ cells and data analysis and interpretation. LC and MB took part in

the conception and design of the study, data interpretation, and manuscript writing. All the authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Sang Wang Han (UNIFESP—Brazil) for pT2-GFP and SB100× plasmids, Richard Morgan (NIH) for pT3-GFP plasmid, and Amilcar Tanuri (UFRJ) for pRGS-CR plasmid. The authors also thank all the researchers who provided the cell lines used in this study.

FUNDING

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazilian National Cancer Institute (INCA), and Oncobiology program/Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2016.00099/full#supplementary-material>.

REFERENCES

- Aiuti, A., Biasco, L., Scaramuzza, S., Ferrua, F., Cicalese, M. P., Baricordi, C., et al. (2013). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science* 341, 1233151. doi:10.1126/science.1233151
- Aluigi, M., Fogli, M., Curti, A., Isidori, A., Gruppioni, E., Chiodoni, C., et al. (2006). Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 454–461. doi:10.1634/stemcells.2005-0198
- Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A. A., Kim, S., et al. (2012). The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483, 603–607. doi:10.1038/nature11003
- Beane, J. D., Lee, G., Zheng, Z., Mendel, M., Abate-Daga, D., Bharathan, M., et al. (2015). Clinical Scale zinc finger nuclease-mediated gene editing of PD-1 in tumor infiltrating lymphocytes for the treatment of metastatic melanoma. *Mol. Ther.* 23, 1380–1390. doi:10.1038/mt.2015.71
- Behr, J.-P. (2012). Synthetic gene transfer vectors II: back to the future. *Acc. Chem. Res.* 45, 980–984. doi:10.1021/ar200213g
- Belur, L. R., Frandsen, J. L., Dupuy, A. J., Ingbar, D. H., Largaespada, D. A., Hackett, P. B., et al. (2003). Gene insertion and long-term expression in lung mediated by the sleeping beauty transposon system. *Mol. Ther.* 8, 501–507. doi:10.1016/S1525-0016(03)00211-9
- Berdien, B., Mock, U., Atanackovic, D., and Fehse, B. (2014). TALEN-mediated editing of endogenous T-cell receptors facilitates efficient reprogramming of T lymphocytes by lentiviral gene transfer. *Gene Ther.* 21, 539–548. doi:10.1038/gt.2014.26
- Bilal, M. Y., Vacaflares, A., and Houtman, J. C. (2015). Optimization of methods for the genetic modification of human T cells. *Immunol. Cell Biol.* 93, 896–908. doi:10.1038/icc.2015.59
- Blower, P. E., Verducci, J. S., Lin, S., Zhou, J., Chung, J.-H., Dai, Z., et al. (2007). MicroRNA expression profiles for the NCI-60 cancer cell panel. *Mol. Cancer Ther.* 6, 1483–1491. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0009
- Bonamino, M., Serafini, M., D'Amico, G., Gaipa, G., Todisco, E., Bernasconi, S., et al. (2004). Functional transfer of CD40L gene in human B-cell precursor ALL blasts by second-generation SIN lentivectors. *Gene Ther.* 11, 85–93. doi:10.1038/sj.gt.3302141
- Chicaybam, L., and Bonamino, M. H. (2014). Moving receptor redirected adoptive cell therapy toward fine tuning of antitumor responses. *Int. Rev. Immunol.* 33, 402–416. doi:10.3109/08830185.2014.917412
- Chicaybam, L., Sodre, A. L., Curzio, B. A., and Bonamino, M. H. (2013). An efficient low cost method for gene transfer to T lymphocytes. *PLoS ONE* 8:e60298. doi:10.1371/journal.pone.0060298
- de Souza, W. F., Fortunato-Miranda, N., Robbs, B. K., de Araujo, W. M., de-Freitas-Junior, J. C., Bastos, L. G., et al. (2013). Claudin-3 overexpression increases the malignant potential of colorectal cancer cells: roles of ERK1/2 and PI3K-Akt as modulators of EGFR signaling. *PLoS ONE* 8:e74994. doi:10.1371/journal.pone.0074994
- Doudna, J. A., and Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1258096. doi:10.1126/science.1258096
- Faget, D. V., Lucena, P. I., Robbs, B. K., and Viola, J. P. B. (2012). NFAT1 C-terminal domains are necessary but not sufficient for inducing cell death. *PLoS ONE* 7:e47868. doi:10.1371/journal.pone.0047868
- Gillet, J.-P., Varma, S., and Gottesman, M. M. (2013). The clinical relevance of cancer cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 105, 452–458. doi:10.1093/jnci/djt007
- Grabundzija, I., Irgang, M., Mátés, L., Belay, E., Matrai, J., Gogol-Döring, A., et al. (2010). Comparative analysis of transposable element vector systems in human cells. *Mol. Ther.* 18, 1200–1209. doi:10.1038/mt.2010.47
- Gresch, O., Engel, F. B., Nescic, D., Tran, T. T., England, H. M., Hickman, E. S., et al. (2004). New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods* 33, 151–163. doi:10.1016/j.ymeth.2003.11.009
- Griffin, J. L., and Shockcor, J. P. (2004). Metabolic profiles of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* 4, 551–561. doi:10.1038/nrc1390
- Hamid, O., Robert, C., Daud, A., Hodi, F. S., Hwu, W.-J., Kefford, R., et al. (2013). Safety and tumor responses with lambrolizumab (Anti-PD-1) in melanoma. *N. Engl. J. Med.* 369, 134–144. doi:10.1056/NEJMoa1305133

- Hausl, M. A., Zhang, W., Mütter, N., Rauschhuber, C., Franck, H. G., Merricks, E. P., et al. (2010). Hyperactive sleeping beauty transposase enables persistent phenotypic correction in mice and a canine model for hemophilia B. *Mol. Ther.* 18, 1896–1906. doi:10.1038/mt.2010.169
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, L., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821. doi:10.1126/science.1225829
- Jordan, M., and Wurm, F. (2004). Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. *Methods* 33, 136–143. doi:10.1016/j.ymeth.2003.11.011
- Kim, H., and Kim, J.-S. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat. Rev. Genet.* 15, 321–334. doi:10.1038/nrg3686
- Kim, H., Um, E., Cho, S.-R., Jung, C., Kim, H., and Kim, J.-S. (2011). Surrogate reporters for enrichment of cells with nuclease-induced mutations. *Nat. Methods* 8, 941–943. doi:10.1038/nmeth.1733
- Kotnik, T., Frey, W., Sack, M., Haberl Meglič, S., Peterka, M., and Miklavčič, D. (2015). Electroporation-based applications in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 33, 480–488. doi:10.1016/j.tibtech.2015.06.002
- Kowarz, E., Löscher, D., and Marschalek, R. (2015). Optimized sleeping beauty transposons rapidly generate stable transgenic cell lines. *Biotechnol. J.* 10, 647–653. doi:10.1002/biot.201400821
- Kuystermans, D., and Al-Rubeai, M. (2015). “Biopharmaceutical Products from Animal Cell Culture,” in *Animal Cell Culture Cell Engineering*. Springer International Publishing, 717–757. doi:10.1007/978-3-319-10320-4_23
- Martin, P. K., Stilhano, R. S., Samoto, V. Y., Takiya, C. M., Peres, G. B., da Silva Michelacci, Y. M., et al. (2014). Mesenchymal stem cells do not prevent antibody responses against human α -L-iduronidase when used to treat mucopolysaccharidosis type I. *PLoS ONE* 9:e92420. doi:10.1371/journal.pone.0092420
- Mátés, L., Chuah, M. K. L., Belay, E., Jerchow, B., Manoj, N., Acosta-Sanchez, A., et al. (2009). Molecular evolution of a novel hyperactive sleeping beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat. Genet.* 41, 753–761. doi:10.1038/ng.343
- Mir, L. M. (2014). Electroporation-based gene therapy: recent evolution in the mechanism description and technology developments. *Methods Mol. Biol.* 1121, 3–23. doi:10.1007/978-1-4614-9632-8_1
- Nishizuka, S., Charboneau, L., Young, L., Major, S., Reinhold, W. C., Waltham, M., et al. (2003). Proteomic profiling of the NCI-60 cancer cell lines using new high-density reverse-phase lysate microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 14229–14234. doi:10.1073/pnas.2331323100
- Park, E. S., Rabinovsky, R., Carey, M., Hennessy, B. T., Agarwal, R., Liu, W., et al. (2010). Integrative analysis of proteomic signatures, mutations, and drug responsiveness in the NCI 60 cancer cell line set. *Mol. Cancer Ther.* 9, 257–267. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0743
- Peng, P. D., Cohen, C. J., Yang, S., Hsu, C., Jones, S., Zhao, Y., et al. (2009). Efficient nonviral sleeping beauty transposon-based TCR gene transfer to peripheral blood lymphocytes confers antigen-specific antitumor reactivity. *Gene Ther.* 16, 1042–1049. doi:10.1038/gt.2009.54
- Ramanayake, S., Bilmon, I., Bishop, D., Dubosq, M.-C., Blyth, E., Clancy, L., et al. (2015). Low-cost generation of good manufacturing practice-grade CD19-specific chimeric antigen receptor-expressing T cells using piggyBac gene transfer and patient-derived materials. *Cytotherapy* 17, 1251–1267. doi:10.1016/j.jcyt.2015.05.013
- Sartore, R. C., Campos, P. B., Trujillo, C. A., Ramalho, B. L., Negraes, P. D., Paulsen, B. S., et al. (2011). Retinoic acid-treated pluripotent stem cells undergoing neurogenesis present increased aneuploidy and micronuclei formation. *PLoS ONE* 6:e20667. doi:10.1371/journal.pone.0020667
- Satkaukas, S., Ruzgys, P., and Venslauskas, M. S. (2012). Towards the mechanisms for efficient gene transfer into cells and tissues by means of cell electroporation. *Expert Opin. Biol. Ther.* 12, 275–286. doi:10.1517/14712598.2012.654775
- Schumann, K., Lin, S., Boyer, E., Simeonov, D. R., Subramaniam, M., Gate, R. E., et al. (2015). Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 10437–10442. doi:10.1073/pnas.1512503112
- Singh, H., Moyes, J. S. E., Huls, M. H., and Cooper, L. J. N. (2015). Manufacture of T cells using the sleeping beauty system to enforce expression of a CD19-specific chimeric antigen receptor. *Cancer Gene Ther.* 22, 95–100. doi:10.1038/cgt.2014.69
- Szulc, J., Wiznerowicz, M., Sauvain, M.-O., Trono, D., and Aebischer, P. (2006). A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nat. Methods* 3, 109–116. doi:10.1038/nmeth846
- Vargas, J. E., Salton, G., Sodr  de Castro Laino, A., Pires, T. D., Bonamino, M., Lenz, G., et al. (2012). pLR: a lentiviral backbone series to stable transduction of bicistronic genes and exchange of promoters. *Plasmid* 68, 179–185. doi:10.1016/j.plasmid.2012.06.001
- Wang, T., Upponi, J. R., and Torchilin, V. P. (2012). Design of multifunctional non-viral gene vectors to overcome physiological barriers: dilemmas and strategies. *Int. J. Pharm.* 427, 3–20. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.07.013
- Weber, K., Bartsch, U., Stocking, C., and Fehse, B. (2008). A multicolor panel of novel lentiviral “gene ontology” (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol. Ther.* 16, 698–706. doi:10.1038/mt.2008.6
- Yarmush, M. L., Golberg, A., Serša, G., Kotnik, T., and Miklavčič, D. (2014). Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 16, 295–320. doi:10.1146/annurev-bioeng-071813-104622
- Yin, H., Kanasty, R. L., Eltoukhy, A. A., Vegas, A. J., Dorkin, J. R., and Anderson, D. G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* 15, 541–555. doi:10.1038/nrg3763

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Chicaybam, Barcelos, Peixoto, Carneiro, Limia, Redondo, Lira, Paraguassu-Braga, Vasconcelos, Barros and Bonamino. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.